

# Mestrado Integrado em Engenharia Química

## *Deteção individual de TCA em rolhas de cortiça: otimização de um sistema para análise de rolhas naturais*

### Tese de Mestrado

de

Inês Pinto Guimarães

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Amorim & Irmãos S.A. - Investigação e Desenvolvimento



Orientador na FEUP: Prof. Dr.<sup>a</sup> Margarida Bastos

Orientador na Amorim & Irmãos S.A.: Dr. Miguel Cabral



Universidade do Porto  
Faculdade de Engenharia  
**FEUP**

Departamento de Engenharia Química

Fevereiro de 2015

---

---

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus orientadores, ao Doutor Miguel Cabral por me ter dado a oportunidade de realizar o estágio curricular no Departamento I&D, por todo o acompanhamento, pelos ensinamentos e pela confiança depositada no meu trabalho; à Professora Doutora Margarida Bastos por toda o auxílio e dedicação demonstrados ao longo do projeto.

Ao Doutor Paulo Lopes pelo interesse e apoio prestado no projeto e à Doutora Isabel Roseira por toda simpatia demonstrada ao longo do estágio.

Ao Carlos Costa, pelos conhecimentos que me transmitiu, por todo o acompanhamento, pelo apoio incansável e pela amizade demonstrada ao longo de toda esta etapa.

Às minhas colegas do I&D, Ana Malheiro, Eliana Reis, Patrícia Oliveira, Salomé Reis e Rosa Castro, por me terem integrado, pelo auxílio e apoio prestados e pelos momentos de convívio e amizade proporcionados durante o estágio curricular. Aos meus colegas de estágio, Frederico Machado e Alexandra Valente, por terem partilhado comigo esta etapa.

Aos colaboradores do Labcork pelo companheirismo e pela preocupação constante ao longo do projeto.

Aos funcionários da PortoCork pela colaboração neste projeto.

Aos meus amigos, Alberta Mendes, Maria Afonso, Margarida Santos, Tiago Andrade, Sérgio Amado, Gonçalo Santos, Ana Rita Campos e Luís Gonçalves, que acompanharam bem de perto o meu percurso, tanto académico como pessoal, e foram os primeiros a amparar-me quando mais precisei.

Ao Ricardo Martins, que esteve sempre disponível para me ouvir e para me apoiar, agradeço sobretudo pela dedicação, confiança, paciência e compreensão ao longo deste projeto.

Por fim gostaria de agradecer à minha família por todo o apoio e carinho. Em especial, ao meu irmão e aos meus pais, pelo apoio incondicional, pela paciência, pelos bons valores incutidos e por me proporcionarem as melhores condições que me permitiram chegar até aqui.

---

## Resumo

O 2,4,6-tricloroanisol (TCA) é um composto presente na cortiça, que pode provocar alterações organoléticas nos vinhos vedados com rolhas de cortiça natural. A contaminação nos vinhos provocada por este composto constitui uma preocupação para a indústria corticeira, levando esta a implementar medidas preventivas, curativas e de controlo da qualidade durante o processo de produção de rolhas naturais, para reduzir a incidência de TCA.

Este projeto de dissertação teve como objetivo otimizar um novo sistema de deteção individual de TCA, S1, que será inserido no processo industrial de produção de rolhas de cortiça natural, na Amorim & Irmãos, S.A..

Numa primeira fase, procedeu-se à otimização dos parâmetros experimentais do método cromatográfico, obtendo-se um método de análise com duração de 16 s e com um limite de deteção de TCA de 2 ng/L.

A segunda fase do projeto consistiu na validação do sistema S1. Para tal, utilizaram-se rolhas naturais com concentrações de TCA conhecidas previamente analisadas pelo método SPME-GC-ECD (método de rotina do I&D). A eficácia de deteção do S1 para concentração de TCA igual ou superior a 2 ng/L foi de 91,2 %.

**Palavras-chave (Tema):** rolhas de cortiça natural, 2,4,6-tricloroanisol, cromatografia gasosa, sistema de deteção individual.

---

## Abstract

The 2,4,6-trichloroanisole (TCA) is a compound present in cork that may cause organoleptic changes in wines sealed with natural cork stoppers. The contamination of wine caused by this compound is a problem for the cork industry, leading to implement preventative, curative and quality control measures during the manufacturing process of natural cork stoppers, in order to reduce the incidence of TCA.

This dissertation project aims to optimize a new individual detection system of TCA, S1, which will be inserted in the industrial process of natural cork stoppers production in Amorim & Irmãos, S.A..

Initially, an optimization of the experimental conditions of the chromatographic method was developed, that results in an analytical method with duration of 16 seconds and a TCA concentration detection limit of 2 ng/L.

The second phase of this project consisted in the validation of S1 system. In the validation process, it was used natural corks with known concentrations of TCA previously analyzed by SPME -GC-ECD method (routine method used in I&D). The efficiency of the S1 system was 91,2 % for TCA concentration equal or greater than 2 ng/L.

## Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

*Segunda-feira, 2 de Fevereiro de 2015*

---

(Inês Pinto Guimarães)

---

# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1	2,4,6-Tricloroanisol .....	3
1.1.1	Mecanismo de formação de TCA.....	3
1.1.2	Técnicas de prevenção/eliminação TCA .....	4
1.2	Contributos do Trabalho.....	7
1.3	Organização da Tese .....	8
<b>2</b>	<b>Contexto e Estado da Arte .....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Descrição Técnica.....</b>	<b>13</b>
3.1	Análise de TCA extraível pelo método SPME-GC-ECD .....	13
3.2	Deteção individual de TCA em rolhas de cortiça natural por GC-ECD .....	13
3.2.1	Descrição do equipamento .....	13
3.2.2	Modo operativo do equipamento S1 .....	20
3.2.3	Procedimento de validação do S1 .....	22
<b>4</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>23</b>
4.1	Otimização do método cromatográfico .....	23
4.1.1	Temperatura das colunas cromatográficas .....	23
4.1.2	Temperatura do injetor .....	24
4.1.3	Temperatura do detetor (ECD) .....	25
4.1.4	Fluxos de gás de arraste nas colunas cromatográficas .....	25
4.1.5	Fluxo de gás de arraste ( <i>Carrier gas</i> ).....	26
4.1.6	Fluxo de gás auxiliar - <i>Make-up</i> .....	27
4.1.7	Corrente elétrica do ECD .....	28
4.1.8	Sensibilidade .....	29
4.1.9	Tempo de injeção .....	29
4.1.10	<i>Heartcut</i> .....	29
4.1.11	Otimização do S1 .....	30
4.2	Validação do sistema de deteção individual S1 .....	32
<b>5</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>35</b>

<b>5.1</b>	<b>Outros Trabalhos Realizados.....</b>	<b>36</b>
5.1.1	Validação da MDI na deteção individual de TCA em rolhas de cortiça natural.....	36
<b>5.2</b>	<b>Trabalho futuro .....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>Referências .....</b>	<b>40</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>Análise por SPME-GC-ECD.....</b>	<b>43</b>
<b>Anexo 2</b>	<b>Características das colunas cromatográficas - S1 .....</b>	<b>45</b>
<b>Anexo 3</b>	<b>Resultados da Validação do S1.....</b>	<b>46</b>
<b>Anexo 4</b>	<b>Resultados obtidos da análise após um ano de engarrafamento .....</b>	<b>50</b>



# Índice de Figuras

<i>Figura 1. Concentrações médias trimestrais de TCA em macerações de rolhas naturais entre 2002 e 2014. Adaptado de The Cork Quality Council, 2014.</i>	2
<i>Figura 2. Headspace de uma garrafa de vinho vedada com uma rolha de cortiça natural.</i>	3
<i>Figura 3. Mecanismo de formação do 2,4,6-TCA, exemplificando a principal via de formação dos cloroanisóis. Adaptado de Vasconcelos, 2012.</i>	4
<i>Figura 4. Conjunto de ações de combate ao TCA implementados na A&amp;I.</i>	4
<i>Figura 5. Máquina de deteção individual de TCA, MDI: a) alimentação; b) incubação; c) análise cromatográfica; d) segregação.</i>	11
<i>Figura 6. Protótipo laboratorial, MDI Evolution.</i>	11
<i>Figura 7. Piloto industrial E1.</i>	14
<i>Figura 8. a) Auto-sampler; b) módulo de incubação.</i>	14
<i>Figura 9. Controladores de fluxo de azoto das câmaras de incubação - MFC.</i>	15
<i>Figura 10. Câmaras de incubação: a) mola existente na parte móvel; b) vedante de teflon com mola no interior.</i>	16
<i>Figura 11. a) Válvula de 8 vias do módulo de incubação; b) transfer-line.</i>	16
<i>Figura 12. Detetor ECD.</i>	17
<i>Figura 13. Forno cromatográfico: a) válvula de diafragma; b) loop cromatográfico; c) válvula de rotação STF; d) colunas cromatográficas; e) válvula de rotação SC.</i>	17
<i>Figura 14. Software AmorimCleanCork Version 3.1a.</i>	18
<i>Figura 15. “Tunning and Direct Control” do software AmorimCleanCork Version 3.1a.</i>	19
<i>Figura 16. Sistema de deteção individual S1.</i>	19
<i>Figura 17. Sistema de alimentação das rolhas de cortiça ao S1: a) alimentador centrifugo; b) martelo pneumático; c) buffer; d) auto-sampler.</i>	20
<i>Figura 18. Segregação das rolhas de cortiça natural: a) saída de rolhas positivas; b) saída de rolhas negativas.</i>	21
<i>Figura 19. Análise Cromatográfica: a) rolha negativa; b) rolha positiva.</i>	22
<i>Figura 20. Cromatogramas obtidos para valores de temperatura das colunas cromatográficas entre 90 e 110 °C.</i>	24
<i>Figura 21. Influência da temperatura do detetor (°C) na área do pico de TCA.</i>	25
<i>Figura 22. Influência do fluxo de azoto das colunas cromatográficas na análise cromatográfica de TCA.</i>	26

<i>Figura 23. Influência do fluxo de make-up na resolução da área do pico de TCA. ....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 24. Influência da intensidade da corrente ECD na área do pico de TCA. ....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 25. Cromatogramas obtidos para diferentes valores de heartcut. ....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 26. Concentração de TCA (ng/L) em vinhos analisados após 1 mês de engarrafamento, em que “lq” corresponde ao limite de quantificação de TCA (0,5 ng/L) do método SPME-GC-MS (Figueiredo, 2014). ....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 27. Concentração de TCA (ng/L) em vinhos analisados após 2 meses de engarrafamento, em que “lq” corresponde ao limite de quantificação de TCA (0,5 ng/L) do método SPME-GC-MS (Figueiredo, 2014). ....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 28. Concentração de TCA nos vinhos analisados após 1 ano de engarrafamento, em que “lq” corresponde ao limite de quantificação de TCA (0,5 ng/L) do método SPME-GC-MS ....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 29. Equipamento de análise por SPME-GC-ECD: a) autosampler; b) cromatógrafo.....</i>	<i>43</i>

# Índice de Tabelas

<i>Tabela 1. Processos curativos patenteados e usados na produção de rolhas de cortiça, na A&amp;I. ....</i>	<i>6</i>
<i>Tabela 2. Especificidades e eficácia da MDI e MDI Evolution. ....</i>	<i>11</i>
<i>Tabela 3. Parâmetros experimentais dos métodos de análise cromatográfico de cada módulo do S1 (P1 a P6).....</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 4. Resultados obtidos da validação do S1. ....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 5. Gamas de concentração de TCA obtidas nas amostras de vinho analisadas após 1 ano de engarrafamento.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 6. Condições experimentais do método de análise de TCA por SPME-GC-ECD, no I&amp;D. ....</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 7. Resultados da deteção de rolhas naturais com concentrações previamente conhecidas em quatro módulos do S1.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 8. Resultados de TCA em amostras de vinho, após 1 ano de engarrafamento, vedado com rolhas consideradas negativas pela MDI. ....</i>	<i>50</i>
<i>Tabela 9. Resultados de TCA em amostras de vinho, após 1 ano de engarrafamento, vedado com rolhas consideradas positivas pela MDI. ....</i>	<i>53</i>

## Notação e Glossário

TCA	2,4,6-tricloroanisol
TCP	2,4,6-triclorofenol
PCA	Pentacloanisol
TeCP	2,3,4,6-tetracloroanisol
TBA	2,4,6-tribromoanisol
SPME	Micro-extração em fase sólida
GC	Cromatografia em fase gasosa
ECD	Detetor de captura eletrónica
MS	Espectrometria de massa
A&I	Amorim e Irmãos, S.A.
I&D	Investigação e Desenvolvimento
APCOR	Associação Portuguesa da Cortiça
CQC	Cork Quality Council
CTCOR	Centro Tecnológico da Cortiça
CIPR	Código Internacional das Boas Práticas Rolheiras
MDI	Máquina de Deteção Individual
PDMS	Polidimetilsiloxano
PID	Proporcional, Integral e Derivativo
LD	Limite mínimo de deteção
MFC	Mass Flow Controlers

# 1 Introdução

A Corticeira Amorim SPGS, S.A., criada em 1870, é a maior empresa a nível mundial de produtos de cortiça, com mercado distribuído por todos os continentes, contando com 87 empresas e 32 unidades industriais. Até Setembro do ano de 2014, o Grupo Amorim atingiu 429,6 milhões de euros em vendas, em que praticamente todas as unidades de negócio apresentaram um crescimento de vendas face ao ano de 2013 (Corticeira Amorim, 2014).

A empresa é constituída por cinco unidades de negócio: matérias-primas, rolhas, revestimentos, aglomerados compósitos e isolamentos, sendo a mais relevante a unidade de negócio das rolhas, Amorim & Irmãos, S.A. (A&I), que representa cerca de 64 % do volume de negócios da Corticeira Amorim SPGS, S.A.. Os principais mercados são os países produtores e engarrafadores de vinho, destacando-se nos mercados tradicionais a França, a Itália, a Espanha, a Alemanha e Portugal, e nos novos mercados do vinho os USA, a Austrália, o Chile, a África do Sul e a Argentina (Corticeira Amorim, 2014). A produção de rolhas dá origem a uma quantidade significativa de subprodutos, utilizados como matéria-prima para as indústrias de aglomerados e de revestimentos, tornando-as economicamente sustentáveis. Esta unidade industrial torna-se por isso fulcral para o equilíbrio económico do Grupo Amorim.

A cortiça é produzida pelo sobreiro, *Quercus suber* L., uma árvore que está localizada principalmente nas zonas mediterrânicas, estendendo-se para o Atlântico, a norte pelo Sul da Europa e a sul pelo Norte de África. Em Portugal, o sobreiro ocupa uma área de 715 922 ha<sup>2</sup>, em que cerca de 84 % está situada no Alentejo (Fortes, 2004). A cortiça é o revestimento exterior do tronco e ramos do sobreiro. Esta é formada por células microscópicas revestidas por suberina, lenhina e polissacarídeos, que lhe conferem propriedades distintas como impermeabilidade, elasticidade, leveza, baixa condutividade térmica, tornando a rolha de cortiça um vedante de qualidade para as garrafas de vidro.

O aparecimento de alterações organoléticas em vinhos é um dos maiores obstáculos da indústria vinícola, pois poem em causa a qualidade dos vinhos. A causa destas alterações organoléticas está associada a compostos presentes na cortiça. A rolha de cortiça é considerada a fonte da contaminação do vinho por cloroanisóis, principalmente pelo 2,4,6-tricloroanisol (TCA) (Coque *et al.*, 2007). O vinho contaminado com estes compostos adquire um gosto a mofo e bafio, que, apesar de não ser prejudicial à saúde humana, é desagradável para o consumidor.

O aumento de problemas com a contaminação de TCA atribuído à rolha de cortiça desencadeou uma revolução no mercado de vedantes para vinho, permitindo a entrada de vedantes alternativos no mercado, como vedantes sintéticos e cápsulas de rosca.

Para que a rolha de cortiça não perdesse a sua posição no mercado, as indústrias corticeiras tiveram a necessidade de se unir, apurar as causas de contaminação e tomar medidas preventivas, curativas e de controlo de qualidade (Afonso, 2009). Centenas de milhões de euros têm sido investidos na erradicação do TCA, na criação de rolhas técnicas de cortiça, constituídas por grânulos de cortiça, material em que há uma maior facilidade em extrair componentes voláteis, assim como na certificação maciça dos procedimentos tecnológicos para extração de TCA e os resultados têm vindo a ser bastante positivos.

O *Cork Quality Council* (CQC), um grupo criado para promover a educação e a melhoria dos procedimentos de garantia da qualidade para as indústrias de vinho e cortiça nos Estados Unidos da América, tem vindo a realizar um estudo trimestral para determinar a percentagem de TCA detetável em rolhas de cortiça natural (CQC, 2014). Os membros CQC realizaram mais de 30 000 amostras por trimestre e os seus resultados mostram uma redução constante nos níveis de TCA nos lotes de rolhas naturais, havendo uma redução da 93 % desde 2001 até ao terceiro trimestre de 2014 (Fig. 1).

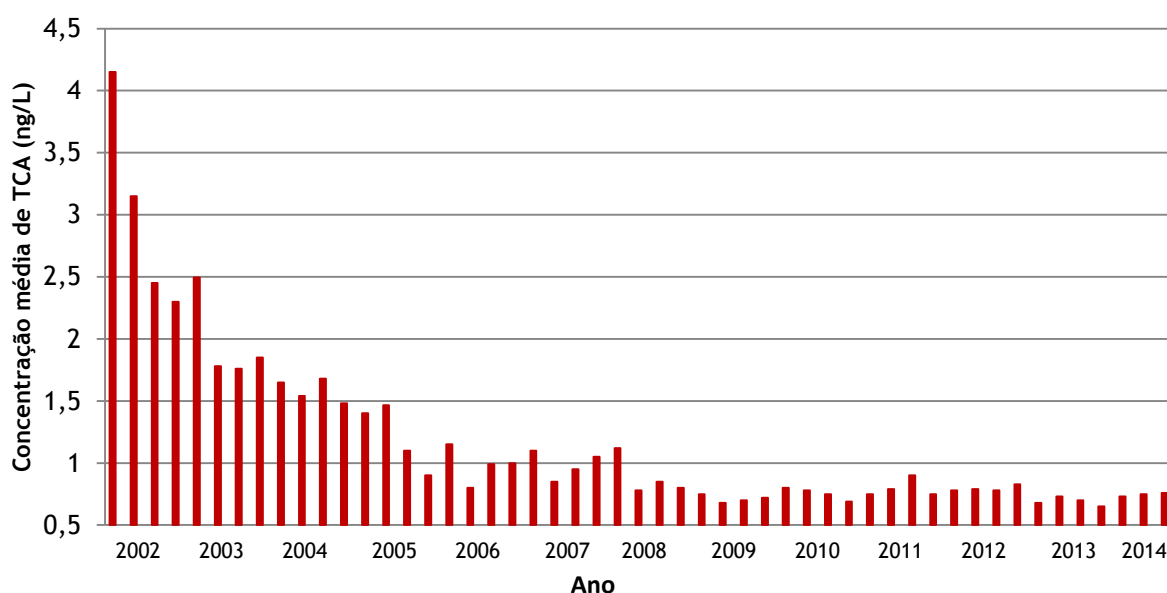


Figura 1. Concentrações médias trimestrais de TCA em macerações de rolhas naturais entre 2002 e 2014. Adaptado de *The Cork Quality Council*, 2014.

Esta redução significativa dos níveis de TCA só foi possível devido ao grande esforço e investimento por parte da indústria corticeira. No entanto, face às exigências do mercado e à crescente concorrência de vedantes alternativos estes valores ainda não são suficientes para garantir ao cliente total erradicação do TCA.

## 1.1 2,4,6-Tricloroanisol

A presença de TCA nas rolhas de cortiça é a principal causa de desvios organoléticos em vinhos. Estudos demonstram que cerca de 80 % das rolhas com alteração organolética continham TCA (Hervé *et al.*, 2004).

O TCA é um composto quimicamente estável, não é degradado ao longo do tempo e pode alterar sensorialmente os vinhos mesmo em concentrações muito baixas (Coque *et al.*, 2007), é muito volátil, podendo migrar facilmente para a fase gasosa durante o processo de tratamento da cortiça, sendo facilmente absorvido por esta.

A localização do TCA na rolha e a orientação desta durante o engarrafamento são parâmetros fundamentais que contribuem para a contaminação ou não do vinho (Capone *et al.*, 2002). A migração do TCA para o vinho só ocorre quando a superfície contaminada da rolha entra em contacto direto com o vinho ou com atmosfera gasosa localizada entre a rolha e o vinho (“headspace” - Fig. 2).



Figura 2. Headspace de uma garrafa de vinho vedada com uma rolha de cortiça natural.

### 1.1.1 Mecanismo de formação de TCA

Os haloanisóis são os compostos responsáveis por desvios sensoriais nos vinhos, em que os principais são os cloroanisóis e os bromoanisóis: 2,4,6-tricloroanisol (2,4,6-TCA), 2,3,4,6-tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA), pentacloroanisol (PCA) e o 2,4,6-tribromoanisol (2,4,6-TBA).

A formação dos haloanisóis advém de um mecanismo de defesa de alguns microorganismos quando expostos a ambientes poluídos por halofenóis. Durante décadas, os clorofenóis foram compostos usados em larga escala em sistemas agroflorestais como biocidas, inseticidas e fungicidas (Sefton *et al.*, 2007). O mecanismo mais aceite que explica a formação dos cloroanisóis é a *O*-metilação dos clorofenóis (Fig. 3), que corresponde à reação de biometilação do 2,4,6-triclorofenol (TCP) realizada por diferentes famílias dos fungos filamentosos que

crescem quer nas pranchas de cortiça, quer nos materiais de madeira existentes nas caves, catalisada pela enzima clorofenol *O*-metiltransferase (CPOMT) (Coque *et al.*, 2006).

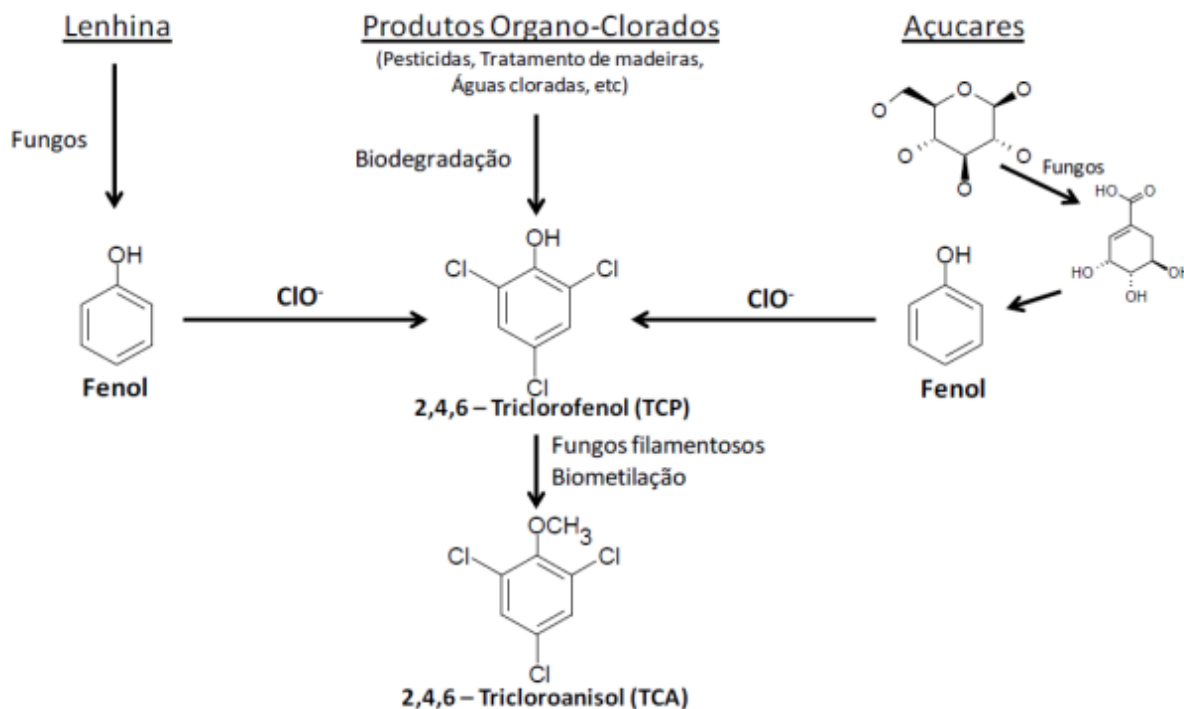


Figura 3. Mecanismo de formação do 2,4,6-TCA, exemplificando a principal via de formação dos cloroanisóis. Adaptado de Vasconcelos, 2012.

### 1.1.2 Técnicas de prevenção/eliminação TCA

Nas últimas décadas, as rolhas de cortiça têm sido consideradas a fonte de contaminação dos vinhos por TCA, levando a indústria corticeira a desenvolver ações de combate a este composto, com desenvolvimento de diversos processos e tecnologias.

Para prevenir a formação de TCA, as empresas corticeiras definiram um conjunto de normas, que fazem parte do Código Internacional das Práticas Rolheiras (CIPR), que constituiu um avanço visível na luta contra a erradicação do TCA, dando início a um conjunto de processos e criação de novas soluções para este problema (C.E. Liège, 2011).

Na A&I, a luta contra o TCA engloba um conjunto de medidas preventivas, curativas e de controlo que estão apresentadas na Fig. 4.

Os processos curativos para extração de TCA em produtos de cortiça patenteados pela Amorim e usados na produção de rolhas de cortiça estão especificados na Tabela 1.





Figura 4. Conjunto de ações de combate ao TCA implementados na A&I.

*Tabela 1. Processos curativos patenteados e usados na produção de rolhas de cortiça, na A&I.*

<b>Tecnologia</b>	<b>INOS II®</b>	<b>ROSA®</b>	<b>ROSA® Evolution</b>
<b>Ano</b>	1998	2004	2007
<b>Patente</b>	EP1108507	DE60306404 T	PT103910 B
<b>Produtos</b>	Discos de Cortiça	Grânulos de cortiça	Discos e rolhas de cortiça natural
<b>Processo</b>	Lavação hidrodinâmica, em autoclave, onde é bombeada água a 70°C, promovendo ciclos de pressurização e despressurização.	Destilação por corrente de vapor controlada.	Destilação por corrente de vapor controlada, com parâmetros de temperatura e humidade otimizados para aplicação em rolhas naturais.
<b>Operação</b>	Provoca uma contração e expansão das lenticelas na cortiça, permitindo à água penetrar na estrutura da cortiça para uma maior eficiência na limpeza.	Uso do vapor permite extração dos compostos voláteis.	Uso do vapor permite extração dos compostos voláteis e as condições operatórias não danificam as propriedades físico-mecânicas das rolhas naturais.
<b>Eficiência de remoção</b>	40%	80%	Entre 77% a 82%

Outras empresas da indústria corticeira desenvolveram novos processos e tecnologias. Em 2004, o Centro Tecnológico da Cortiça (CTCOR) desenvolveu o sistema *Symbios®*, processo biológico preventivo que acompanha o problema durante todas as fases de transformação da cortiça. Com a utilização deste processo, houve uma redução de rolhas contaminadas de 1,2 % para 0,8 %. O processo INNOCORK®, desenvolvido pela *Cork Supply*, utiliza uma mistura de vapor de água e etanol que provoca a rutura das interações entre TCA e a matriz da cortiça e, para prevenir a reabsorção, os contaminantes são extraídos da cortiça por ação de uma corrente de ar comprimido (Cork Supply, 2014).

Em 2000, o departamento de Investigação e Desenvolvimento da A&I foi criado com o objetivo de melhorar o desempenho das rolhas de cortiça e essencialmente resolver o problema de TCA (Amorim Cork, 2014). Diariamente, no I&D, são analisadas rolhas de cortiça retiradas de vários lotes das unidades industriais da A&I. Como forma de extrair o TCA da cortiça, são macerados conjuntos de 10 ou mais rolhas de um determinado lote em solução hidroalcoólica a 12 %, sendo posteriormente a solução analisada por cromatografia gasosa (GC), envolvendo processos de micro-extração em fase sólida (SPME).

Apesar de simples e eficaz, este método apresenta a desvantagem resultante da heterogeneidade de contaminação por TCA dos lotes de rolhas de cortiça, sendo difícil conseguir em cada amostra uma verdadeira representatividade da contaminação do lote.

Para combater estas limitações, o I&D desenvolveu uma tecnologia que tem como conceito a análise de deteção individual de TCA em rolhas de cortiça natural. Esta tecnologia é aplicada num equipamento industrial, designado por MDI (Máquina de Deteção Individual), dotado de um sistema de deteção por cromatografia em fase gasosa por captura de eletrões (GC-ECD), com a capacidade de operar autonomamente, analisando e separando as rolhas contaminadas do processo. O tempo de análise de cada rolha dura 20 s, tendo um limite mínimo de deteção (LD) de TCA de 5 ng/L (Costa, 2012).

Tendo como base a MDI, foi desenvolvido um novo projeto que visava a otimização de um novo piloto laboratorial, MDI *Evolution*, com o objetivo de reduzir o tempo de análise e LD. Com este projeto, obteve-se um método cromatográfico que permitia um tempo de análise de 12 s e um LD de 2 ng/L, com uma eficácia de deteção de 79 % em rolhas com concentração de TCA superior a 2 ng/L (Silva, 2014). Os avanços a nível cromatográfico conseguidos e os promissores resultados obtidos na deteção de TCA levaram a que a MDI *Evolution* prosseguisse para um piloto industrial.

O presente projeto tem como objetivo o desenvolvimento e otimização do novo piloto industrial - E1, e, posteriormente, a instalação de uma nova máquina de deteção individual - S1.

## 1.2 Contributos do Trabalho

O projeto desta tese de mestrado é o culminar de um projeto iniciado em 2008, que tinha como objetivo desenvolver um método de análise individual na deteção de TCA em rolhas de cortiça natural sem afetar as suas propriedades. Devido aos excelentes níveis de eficácia de deteção de TCA, a MDI foi inserida no processo de produção de rolhas.

Partindo do princípio do método de análise da MDI, criou-se um protótipo laboratorial capaz de analisar rolhas mais rápido e com menor LD, cujos resultados obtidos na deteção de TCA em rolhas naturais permitiu uma evolução para um novo piloto industrial, E1.

O E1 foi o alvo de estudo e de otimizações desta dissertação, que conduziu à industrialização de um novo sistema de deteção individual, S1, que será incluído no processo de produção de rolhas de cortiça natural.

### 1.3 Organização da Tese

A presente tese está dividida em 5 capítulos.

No primeiro capítulo faz-se uma breve introdução ao Grupo Amorim e à empresa A&I, enquadrando a problemática da contaminação de TCA nas rolhas de cortiça e dos avanços que têm vindo a ser feitos pela indústria corticeira no combate ao TCA. São também referidas as medidas preventivas, curativas e de controlo de qualidade de TCA usadas na produção rolhas de cortiça, pela A&I.

No segundo capítulo evidencia-se a importância da rolha de cortiça natural como vedante e descreve-se os processos de controlo de qualidade de TCA desenvolvidos pelo I&D, introduzindo o novo sistema de deteção individual de TCA em rolhas de cortiça natural.

No terceiro capítulo são explicados os diferentes métodos de análise de TCA em rolhas de cortiça natural e descrito com detalhe o novo equipamento de deteção individual e o seu modo operativo. É também descrito o procedimento seguido para a validação do S1.

No quarto capítulo estão apresentados os testes realizados para a otimização de cada parâmetro experimental do método cromatográfico e os resultados obtidos da validação do novo equipamento.

No quinto capítulo apresentam-se as conclusões e os objetivos que foram cumpridos do projeto desenvolvido, além dos outros trabalhos realizados ao longo do estágio curricular, onde se prossegue uma parte de um estudo que teve início em 2013, tema de uma dissertação do Mestrado em Engenharia Química, da FEUP, e o trabalho que será desenvolvido no futuro.

## 2 Contexto e Estado da Arte

A rolha de cortiça natural é o vedante preferido da indústria vinícola e dos consumidores de vinho. O êxito da cortiça reside na sua estrutura complexa e única, que lhe permite uma interação benéfica com o vinho.

Nos anos 80 e 90, a rolha de cortiça foi apontada como a fonte principal de contaminação dos vinhos com TCA, dando oportunidade aos vedantes alternativos de entrarem no mercado e ameaçar a sua posição (Afonso, 2009).

Perante a crescente concorrência, a indústria corticeira focou-se na erradicação do problema, nascendo assim o projecto Quercus, lançado pela CELiège, em 1992 que teve como resultado a criação do SYSTECODE (Sistema de Acreditação de Empresas da Indústria da Cortiça mediante o Código Internacional das Práticas Rolheiras - CIPR) que agrupa um conjunto de regras que tiveram como objectivo prevenir a contaminação de TCA nos produtos de cortiça (C.E. Liège, 2011).

A A&I tem realizado uma aposta crescente em I&D com vista à resolução do problema do TCA. Durante a produção das rolhas, são tomadas medidas curativas que recorrem a um conjunto de processos com o objectivo de extrair os contaminantes presentes na cortiça e garantir a qualidade do produto. Também existe uma forte componente no controlo de qualidade, realizado diariamente pelo Departamento de I&D da A&I. O método adotado tem como base a medição de TCA extraível e a sua análise cromatográfica em fase gasosa, sendo capaz de quantificar até uma concentração de 0,5 ng/L. Neste método, as rolhas são maceradas em conjuntos de 10 ou mais rolhas em solução hidroalcoólica a 12 %, mantendo-se em repouso durante 24 h para ocorrer a extração de TCA para a solução. Posteriormente, a solução hidroalcoólica é analisada cromatograficamente (GC) com captura de eletrões (ECD) ou espectroscopia de massa (MS), após concentração do TCA por micro-extração em fase sólida (SPME). Esta metodologia foi desenvolvida pelo laboratório ETS, na Califórnia, onde foi verificado que a quantificação de TCA extraível é um bom indicador da quantidade de TCA presente no vinho engarrafado (Hérve et al., 2004). A desvantagem da maceração composta é que as rolhas não contaminadas podem absorver TCA, diminuindo a concentração média de TCA na solução, havendo um desvio dos resultados. Tal facto já não acontece com as macerações individuais, mas a logística associada à análise de todas as rolhas por maceração individual tornar-se-ia inoportuna.

De maneira a contornar estes obstáculos e a corresponder às exigências do mercado, o Departamento de I&D desenvolveu uma tecnologia capaz de analisar individualmente rolhas de cortiça natural e separar do processo de produção as rolhas contaminadas com TCA. A base do projeto assenta num sistema de deteção GC-ECD, detetor ideal para a deteção de compostos

eletronegativos como é o caso do TCA. A amostra é preparada incubando cada rolha numa câmara cilíndrica individual, cuja temperatura no interior (100 °C) é suficiente para volatilizar o TCA. A amostra é injetada no cromatógrafo através do gás de arraste de elevada pureza (azoto). A amostra ao entrar no detetor passa por um emissor radiativo de partículas, cujo eletrão do emissor provoca a ionização do azoto e produz uma corrente elétrica constante. Estas partículas, ao colidirem com o composto, transformam as moléculas nos respetivos iões, causando variações na corrente elétrica (Skoog et al., 2007). As diferenças de corrente resultantes da formação dos iões, são representadas em função do tempo sob a forma de picos no cromatograma e, através da área integrada desses picos é possível a quantificação dos compostos.

Numa primeira fase, foi criado um protótipo laboratorial, em que se verificou uma deteção de 98 % das rolhas com concentrações de TCA superiores a 5 ng/L (Pereira, 2011). Com estes resultados promissores, o equipamento foi desenvolvido e otimizado, passando de protótipo laboratorial a industrial (Máquina de Deteção Individual, MDI - Fig. 5), capaz de operar autonomamente (Costa, 2012).

Os resultados obtidos da MDI vieram provar à empresa que a análise individual é possível e passível de ser implementada a nível industrial. Por outro lado, a divulgação dos resultados elevou as expectativas dos clientes, às quais a A&I decidiu corresponder. Desta forma, a empresa decidiu otimizar a tecnologia aplicada, de maneira a criar um sistema capaz de detetar TCA mais rapidamente e com menor LD.

O parâmetro mais importante para a redução do tempo de análise e do LD é a redução do teor de oxigénio na amostra injetada. Uma parte do oxigénio provém da própria rolha que liberta ar durante o período de incubação, porém a maior porção resulta de uma incompleta evacuação do ar no interior das câmaras de incubação, diminuindo a sensibilidade do detetor para o TCA. O Departamento I&D desenvolveu um novo protótipo laboratorial deste equipamento (MDI *Evolution* - Fig. 6) com um sistema de amostragem cuja estrutura mecânica e disposição das câmaras de incubação permitiam uma melhor estanquicidade. Desta forma, foi possível obter amostras com menores teores de oxigénio, levando à redução do tempo de análise e do LD (Silva, 2014). Na Tabela 2 estão apresentadas as especificidades e resultados conseguidos nas duas tecnologias referenciadas.

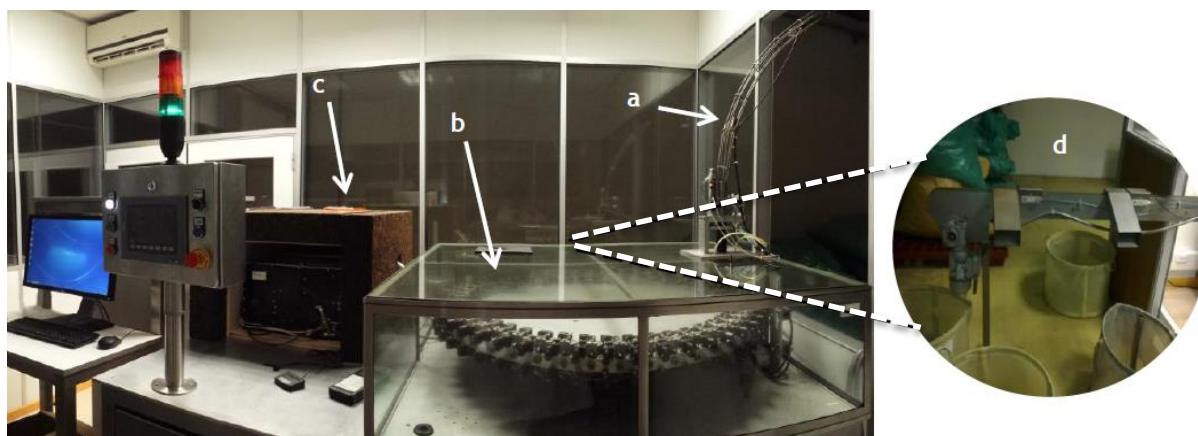


Figura 5. Máquina de deteção individual de TCA, MDI: a) alimentação; b) incubação; c) análise cromatográfica; d) segregação.

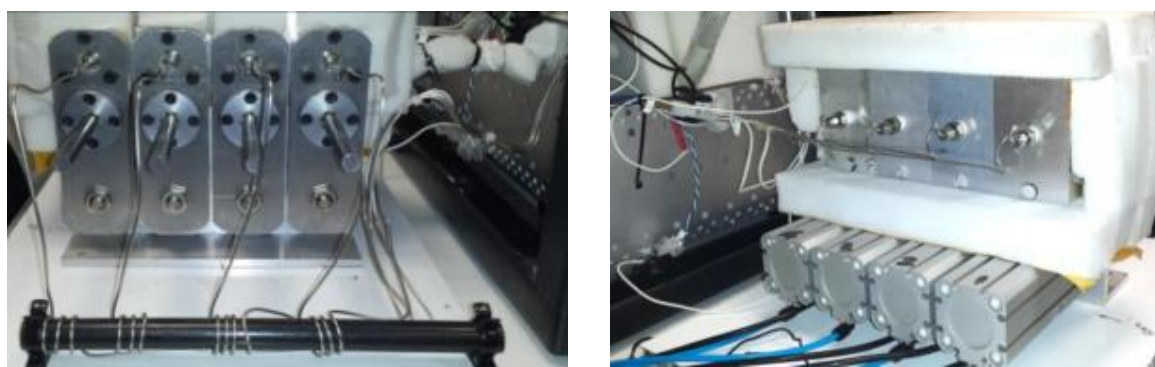


Figura 6. Protótipo laboratorial, MDI Evolution.

Tabela 2. Especificidades e eficácia da MDI e MDI Evolution.

Especificidades	MDI	MDI Evolution
Câmaras de Incubação	Posição vertical Fecho/abertura realizado através de molas	Posição horizontal Fecho/abertura através de um sistema pneumático
Aquecimento	Circulação de um fluído de aquecimento (óleo térmico)	Aquecimento Elétrico
Sistema de amostragem	Móvel	Fixo
LD (ng/L)	≥5	≥2
Tempo de análise (s)	20	12
Eficiência de Deteção (%)	100	79

Estes resultados levaram à decisão de prosseguir os esforços e desenvolvimentos neste tipo de tecnologia com vista à análise individual do maior número possível de rolhas de cortiça com um LD mais baixo possível. Esta nova fase do projeto, no qual se insere esta dissertação, contempla o desenvolvimento de um piloto industrial com base na MDI Evolution - E1, e posteriormente a instalação do sistema final para deteção individual de rolhas de cortiça natural máquina, S1.



## 3 Descrição Técnica

Neste capítulo são descritos:

- a) Os métodos de análise de deteção de TCA por SPME-GC-ECD usado diariamente pelo I&D e de análise individual de TCA dos novos equipamentos E1 e S1.
- b) Os equipamentos E1 e S1 e respetivas otimizações.
- c) Determinação da eficácia do S1.

### 3.1 Análise de TCA extraível pelo método SPME-GC-ECD

As rolhas de cortiça natural usadas na validação dos novos equipamentos de deteção individual de TCA foram analisadas pelo método utilizado diariamente no I&D. Na preparação da amostra, as rolhas foram maceradas individualmente em frascos de 60 mL com solução hidroalcoólica a 12 % (v/v), permanecendo em repouso durante 24 h de maneira ao TCA extraível migrar da superfície da rolha para a solução.

Após este período, as rolhas foram retiradas dos frascos e medidos 10 mL de cada solução para tubos de cromatografia (*vial*) de 20 mL, que continham 3 g de cloreto de sódio. O NaCl tem como objetivo favorecer a volatilização do TCA para o *headspace*. Adicionaram-se 100 µL de padrão interno 2,3,6-tricloroanisol com concentração 20 ng/L, que serve de referência para a análise de espectro obtido e validação da amostra. Posteriormente as amostras foram analisadas por SPME-GC-ECD. As especificações do equipamento e do método da análise encontram-se no Anexo 1.

### 3.2 Deteção individual de TCA em rolhas de cortiça natural por GC-ECD

Nesta fase, procede-se à industrialização de um novo sistema de deteção individual, S1, capaz de analisar 3 milhões de rolhas por ano. Primeiro foi construído o piloto industrial E1, um módulo do S1, que depois de otimizado, permitiu a produção dos restantes módulos do S1.

#### 3.2.1 Descrição do equipamento

O piloto industrial E1 (Fig. 7) teve como base o protótipo laboratorial *MDI Evolution*. Este equipamento é constituído por um módulo de alimentação/extração, um módulo de incubação com 8 câmaras e um módulo de análise.

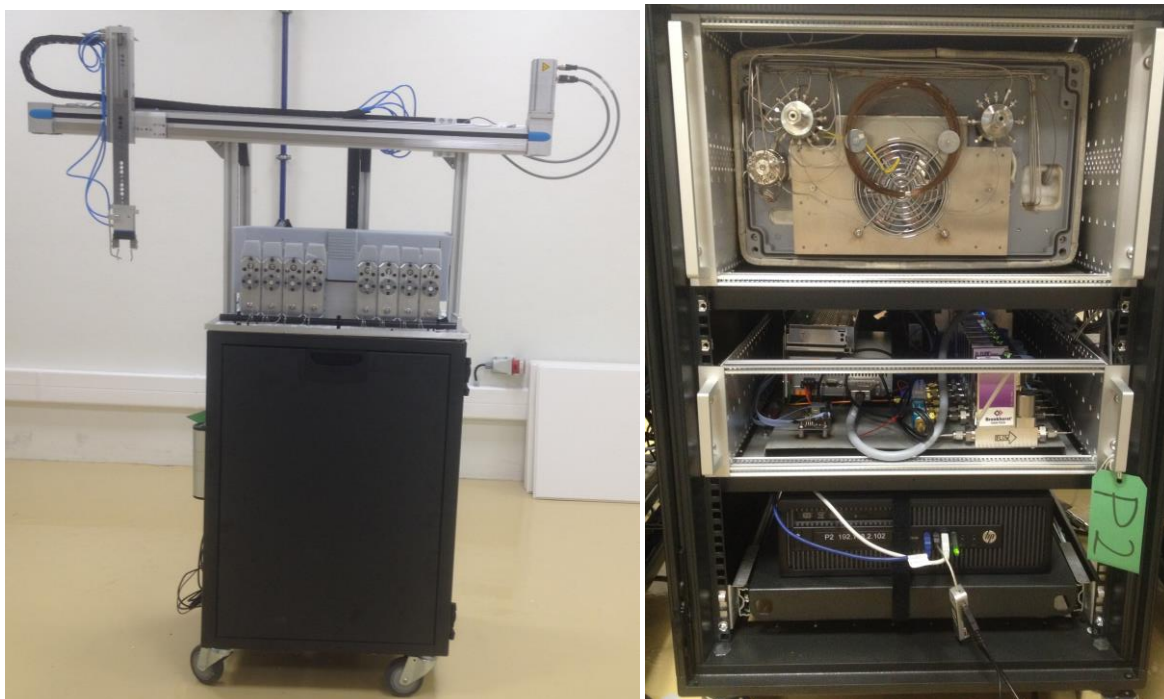


Figura 7. Piloto industrial E1.

O módulo de alimentação/extração contempla um *auto-sampler* (Fig. 8 (a)) que tem funções de alimentação e extração das rolhas nas câmaras de incubação. Os seus movimentos estão coordenados com a abertura/fecho das câmaras de incubação e com a presença/ausência de rolhas no canal de alimentação. No *software* “Festo Configuration Tool” foram predefinidas diferentes coordenadas, que estão relacionadas com as posições de alimentação, da câmara de incubação 1 à 8, das rolhas aceites e das rolhas rejeitadas.

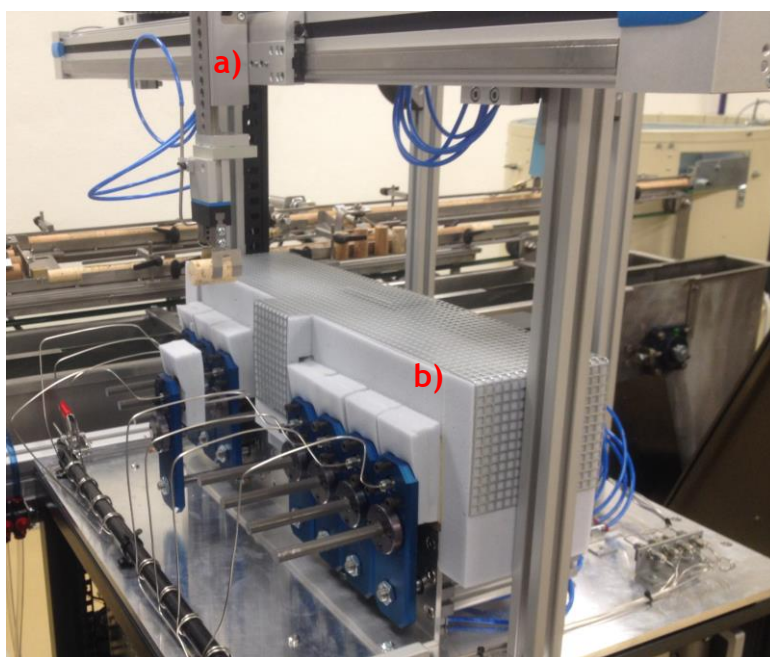


Figura 8. a) Auto-sampler; b) módulo de incubação.

O módulo de incubação (Figura 8 (b)) é constituído por um sistema fixo de 8 câmaras, cada câmara com dimensão 54 mm x 28 mm, colocadas em posição horizontal, o que permite uma maior exposição da rolha ao gás de arraste (azoto). O azoto é injetado no interior das câmaras de incubação através de um tubo metálico, sendo possível controlar o fluxo de azoto durante a incubação. O sistema de controladores de fluxo de azoto, (*Mass Flow Controllers*, MFC- Fig. 9), permite variar automaticamente o fluxo de azoto em cada câmara de incubação durante todo o processo. Durante a introdução da rolha na câmara de incubação, o fluxo de azoto aumenta para evacuar o oxigénio lá existente, sendo seguidamente diminuído de maneira a concentrar a amostra. Esta diferença relativamente à MDI, cujo fluxo de azoto se mantém constante durante todo o processo de incubação, permitiu uma diminuição do tempo de incubação de 10 para 5 minutos. As câmaras do módulo de incubação são aquecidas eletricamente e a temperatura é controlada por um controlador PID (Controlador Proporcional, Integral e Derivativo).



*Figura 9. Controladores de fluxo de azoto das câmaras de incubação - MFC.*

Na MDI, o fecho/abertura das câmaras de incubação realiza-se por ação de molas, enquanto que no E1 é utilizado um sistema pneumático. Em cada câmara, existe um conjunto de molas na parte móvel (Figura 10 (a)) que permitem conter a contrapressão exercida pelos gases no interior da câmara. O vedante usado é de teflon e no seu interior existe uma mola que o adapta à parede da câmara de incubação (Figura 10 (b)). Estas modificações permitiram uma melhoria na estanquicidade das câmaras de incubação e uma redução significativa da quantidade de oxigénio injetado simultaneamente com a amostra no cromatógrafo.

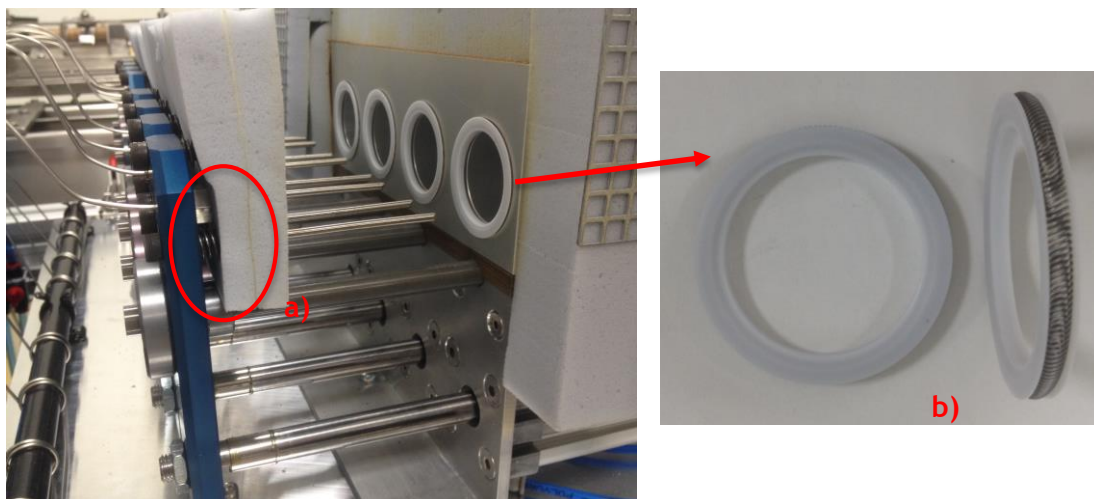


Figura 10. Câmaras de incubação: a) mola existente na parte móvel; b) vedante de teflon com mola no interior.

As oito câmaras de incubação estão ligadas a uma válvula, válvula de 8 vias (Fig. 11 (a)), cuja função é a seleção de qual das câmaras será injetada a amostra no cromatógrafo, a partir de um tubo de cobre revestido denominado *transfer-line* (Fig. 11 (b)), enquanto as outras estão a ser purgadas. No E1, as amostras provenientes das câmaras de incubação estão constantemente em circuito fechado, eliminando-se as entradas de ar após a incubação da rolha.

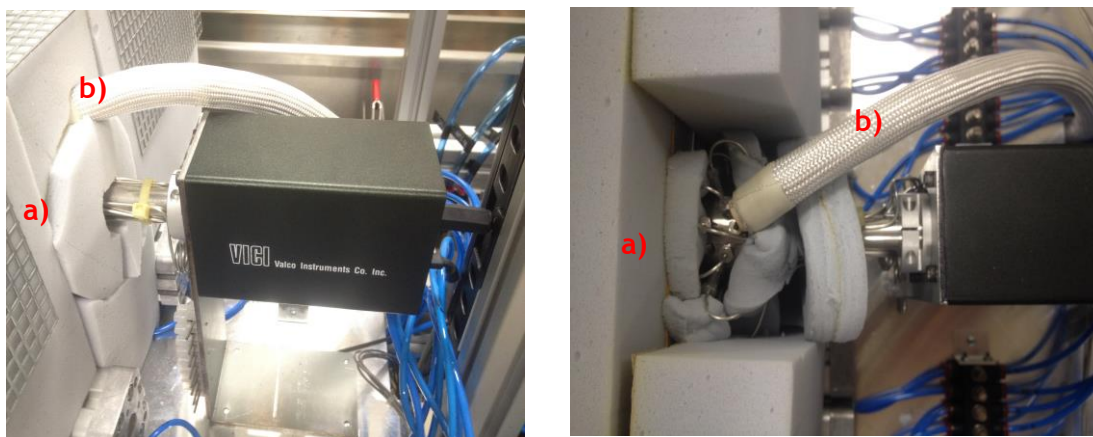


Figura 11. a) Válvula de 8 vias do módulo de incubação; b) transfer-line.

O módulo de análise é composto por um cromatógrafo que analisa amostras em fase gasosa com deteção por captura de eletrões (detetor ECD - Fig. 12).





Figura 12. Detetor ECD.

O forno cromatográfico (Fig. 13) está equipado com uma ventoinha para dispersar o calor e está isolado termicamente para que a temperatura ambiente não interfira com a do forno. Este contém no seu interior um *loop* cromatográfico para concentrar a amostra, uma válvula de diafragma para a injeção da amostra, duas válvulas de rotação para seleccionar a coluna em análise (STF e SC) e 8 colunas cromatográficas. As colunas utilizadas neste equipamento são do tipo ZB-5HT, coluna de baixa polaridade, elevada estabilidade e com uma ampla gama de limites de temperatura. As características deste tipo de coluna estão descritas no Anexo 2.

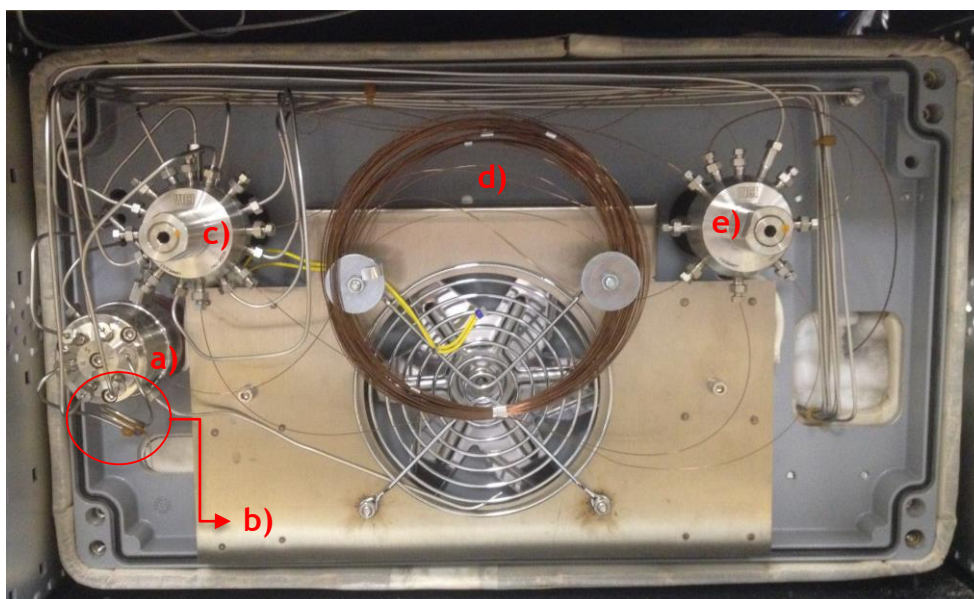


Figura 13. Forno cromatográfico: a) válvula de diafragma; b) *loop* cromatográfico; c) válvula de rotação STF; d) colunas cromatográficas; e) válvula de rotação SC.

Para além das otimizações mecânicas, o *software* “*AmorimCleanCork Version 3.1a*” (Fig. 14), que define o método de análise cromatográfico e controla o equipamento, foi melhorado de maneira a poder ser aplicado ao E1 e a cada módulo do S1.

No processo de otimização do método cromatográfico foram ajustados os seguintes parâmetros: temperatura das colunas cromatográficas, temperatura do detetor, temperatura do injetor, tempo de injeção, *heartcut*, intensidade da corrente elétrica do ECD, fluxos de azoto nas colunas, fluxo de gás de arraste (*carrier gas*), fluxo de gás auxiliar (*make-up*) e sensibilidade.

Para se proceder à otimização, o *software* possui uma interface designada “*Tuning and Direct Control*” (Fig. 15), que permite ajustar o valor dos parâmetros referidos e controlar o equipamento automática ou manualmente. Adicionalmente existe um *software* de apoio ao *AmorimCleanCork*, o “*Clarity*”, que regista ao longo do tempo os picos obtidos de cada amostra nas diferentes colunas, quer em modo manual quer em modo automático.

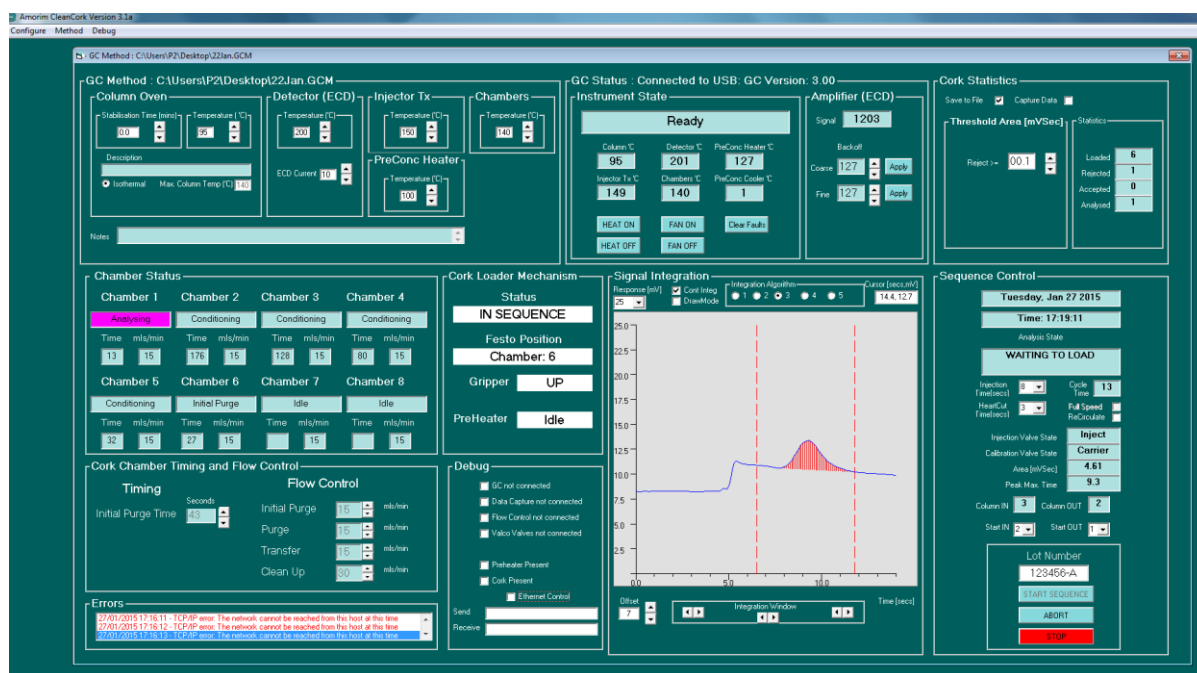


Figura 14. Software AmorimCleanCork Version 3.1a.

Ao completar o equipamento com o *auto-sampler* foi necessário coordenar a função de alimentação/extração automática com as restantes funções do equipamento, tendo sido obrigatório aumentar o tempo de análise de 12 para 16 s, para conciliar os movimentos analíticos com os mecânicos.

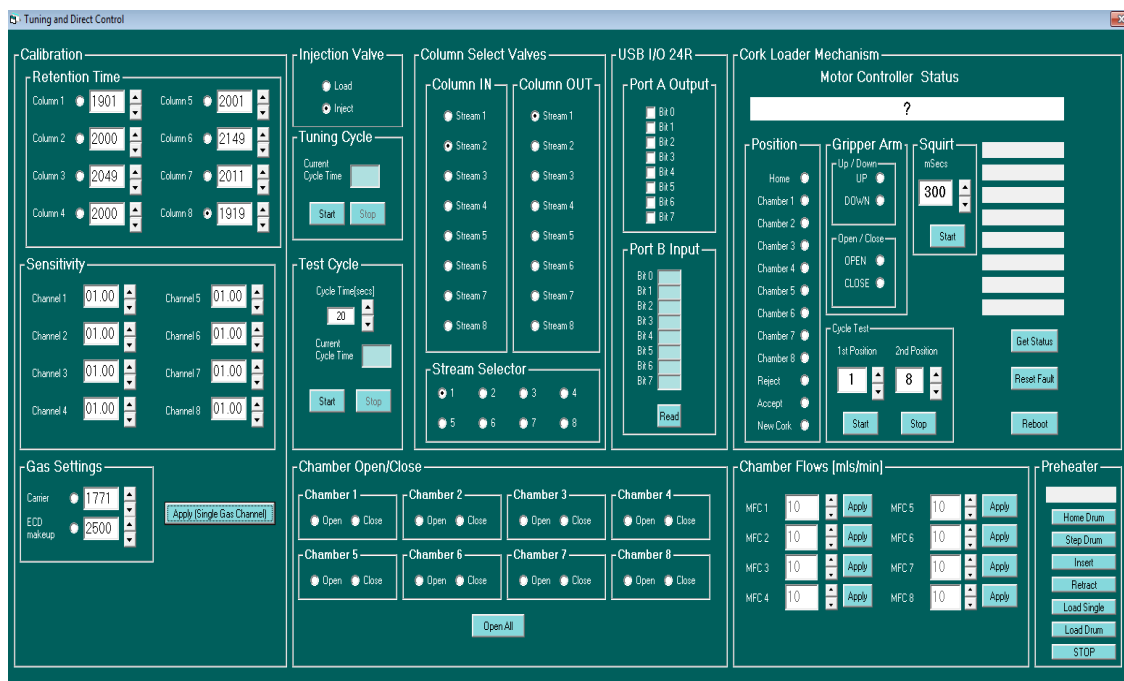


Figura 15. “Tuning and Direct Control” do software AmorimCleanCork Version 3.1a.

Após todas as otimizações, quer a nível mecânico quer a nível analítico, procedeu-se à instalação do novo equipamento de análise individual de TCA em rolhas de cortiça, S1. Este sistema é composto por 6 módulos E1 a funcionar simultaneamente, com alimentação e segregação de rolhas naturais comum (Fig. 16).



Figura 16. Sistema de deteção individual S1.

### 3.2.2 Modo operativo do equipamento S1

Todo o processo do S1 é controlado por um computador, “*Master*”, onde está instalado o *software AmorimSystemControl*, capaz de aceder a cada módulo do S1 e integrá-los como um sistema. O processo de deteção de TCA do equipamento S1 é composto por quatro fases: alimentação, incubação, análise e segregação. Estas fases ocorrem de igual modo em cada um dos 6 módulos.

As rolhas são transportadas para o sistema de alimentação, por intermédio de um elevador. O sistema de alimentação é constituído por um alimentador centrífugo, um corredor central de alimentação, 6 martelos pneumáticos e 6 *buffers* (Fig 17). Todas as ações destes componentes são controladas por sensores de presença/ausência de rolha. O alimentador centrífugo atua por centrifugação e transporta as rolhas para o corredor central de alimentação. Os martelos pneumáticos inseridos no corredor central de alimentação vão empurrando as rolhas para o *buffer* respetivo, até este estar preenchido com um número mínimo de rolhas. Cada *buffer* alimenta um módulo do S1. O *auto-sampler* recolhe a rolha presente no *buffer* e transporta-a para a câmara de incubação respetiva.

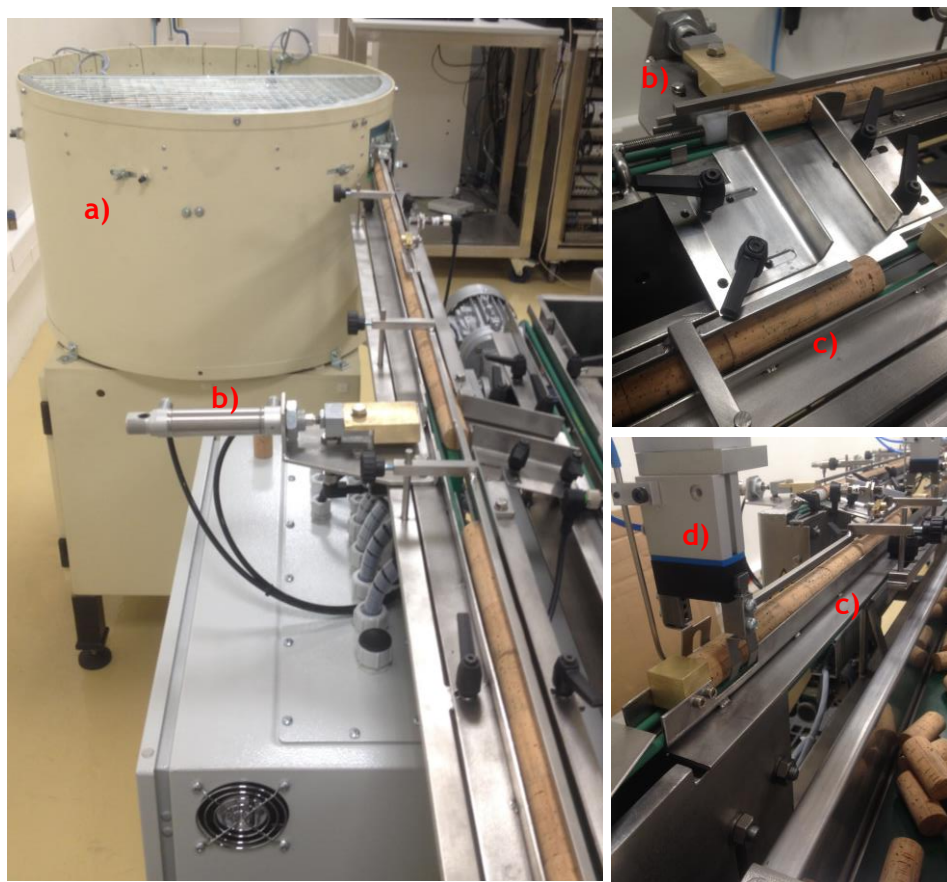


Figura 17. Sistema de alimentação das rolhas de cortiça ao S1: a) alimentador centrífugo; b) martelo pneumático; c) *buffer*; d) *auto-sampler*.



As rolhas permanecem nas câmaras de incubação durante 5 minutos a uma temperatura de 140 °C. As temperaturas das câmaras de incubação têm de ser altas para que o TCA volatilize e seja extraído da rolha. A partir do momento em que a rolha entra na câmara de incubação, o fluxo de azoto permanece a 100 mL/min durante 60 s, permitindo uma melhor evacuação do ar presente. Após esse período, o fluxo de azoto vai diminuindo gradualmente e a passagem deste pela superfície da rolha arrasta o TCA volatilizado e dispersa-o por todo o volume da câmara. O fluxo de azoto diminui até 15 mL/min, concentrando o TCA da amostra.

Após o tempo de incubação, procede-se à análise da amostra. Esta flui através de um canal metálico até à válvula de 8 vias e segue para o cromatógrafo através do *transfer-line*. Este está ligado à válvula de diafragma que, quando em posição *load*, pressuriza o diafragma impedindo a amostra de passar, ficando retida e concentrada no *loop* cromatográfico. Alterando a posição para *inject*, a válvula relaxa o diafragma, permitindo a passagem da amostra para as colunas cromatográficas.

Existem duas válvulas de rotação, “*switching valve*”. A primeira, STF, controla a coluna na qual vai ser injetada a amostra, enquanto que nas restantes colunas é injetado azoto, assegurando assim a sua limpeza. A segunda válvula de rotação, SC, é responsável pela passagem da amostra das colunas cromatográficas para o detetor ECD do cromatógrafo.

Após a análise de uma determinada amostra, a respetiva câmara de incubação abre, o *auto-sampler* segrega a rolha e, conforme o resultado esta é colocada no tapete das rolhas rejeitadas ou das rolhas aceites (Fig. 18 (a) e (b)). Todos os resultados obtidos em cada módulo do S1 são recolhidos pelo *software* do *Master*, que reúne as estatísticas do lote em análise.

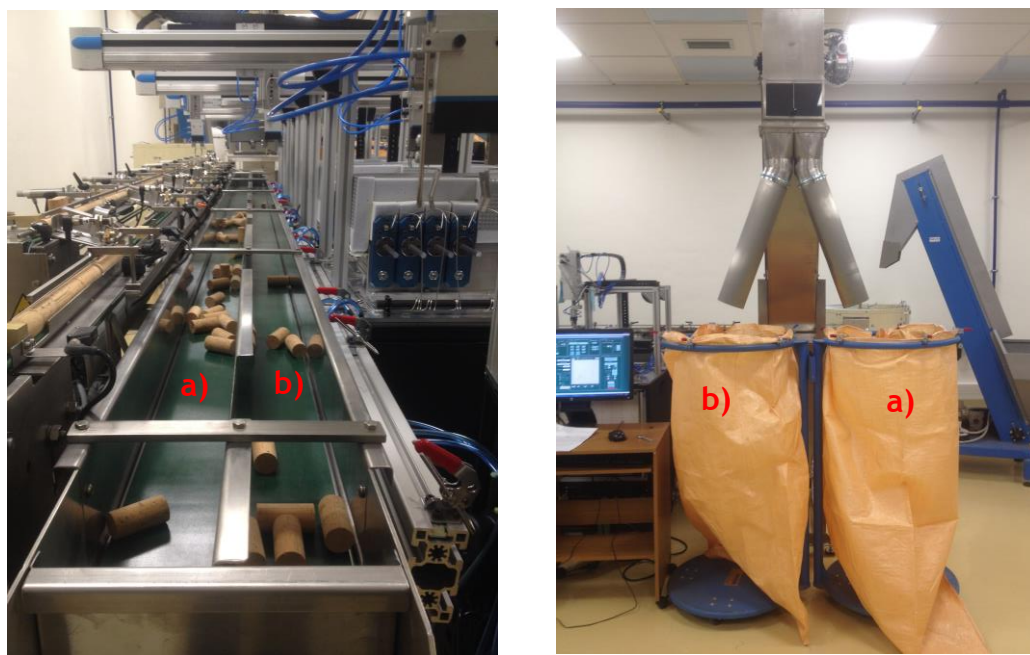


Figura 18. Segregação das rolhas de cortiça natural: a) saída de rolhas positivas; b) saída de rolhas negativas.

### 3.2.3 Procedimento de validação do S1

Para a validação do equipamento S1 recorreu-se a 200 rolhas que foram previamente analisadas na rotina do laboratório de I&D (de acordo com a secção 3.1). Essas rolhas foram analisadas em cada módulo do S1, com o objetivo de calcular a eficácia do novo sistema de deteção individual e a reprodutibilidade entre módulos.

As rolhas foram colocadas manualmente em cada *buffer* e o equipamento operou autonomamente. As rolhas incubaram durante 5 minutos e o tempo de análise cromatográfica durou 16 s.

Os valores resultantes de cada análise foram obtidos por integração da área do pico de TCA presente no cromatograma, em mV/s. Foi definido o valor de rejeição igual a 0,1 mV/s, ou seja, todas as amostras que apresentaram um pico superior a esse valor foram consideradas positivas e as respetivas rolhas rejeitadas pelo equipamento. É importante ter em conta o valor a definir para mínimo de rejeição, de modo a que não sejam rejeitadas rolhas com concentrações inferiores a 0,5 ng/L ou isentas de TCA.

Na Fig. 19, estão apresentados cromatogramas obtidos de amostras de rolhas consideradas positivas e negativas pelo S1.

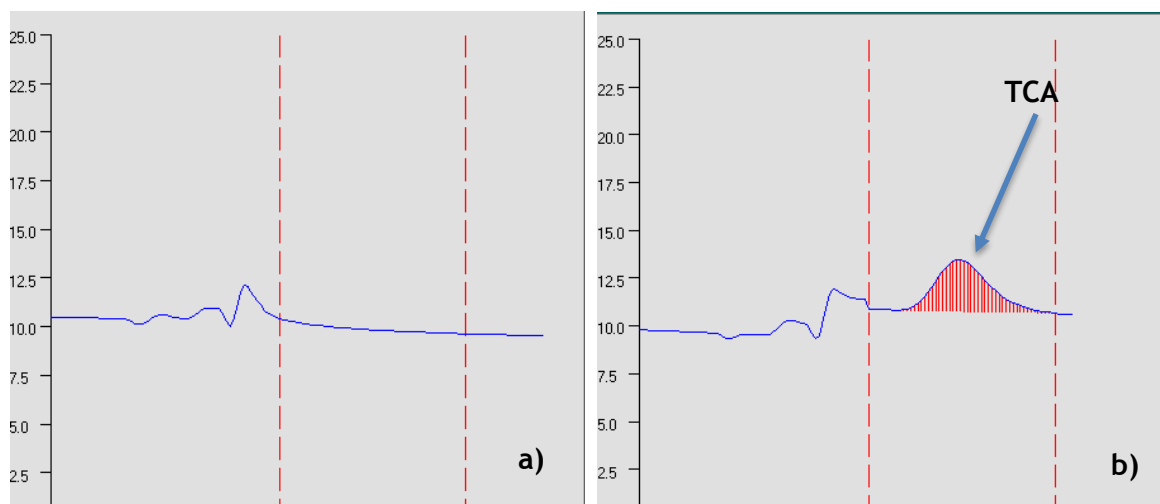


Figura 19. Análise Cromatográfica: a) rolha negativa; b) rolha positiva.

Devido a um problema na válvula STF do módulo P1, que não permitia a passagem de azoto na coluna 8, não foi possível proceder à sua validação, pois os resultados de todas as amostras que passassem por essa coluna não estariam corretos. A validação do método de análise do módulo P5 até à data de conclusão desta dissertação ainda não estava terminada, logo apenas serão apresentados os resultados de validação dos módulos P2, P3, P4 e P6.

## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Otimização do método cromatográfico

Numa primeira fase, foi necessário otimizar os parâmetros experimentais anteriormente referidos, de forma a ser obtido um método eficaz em cada um dos equipamentos. Os testes que procederam à otimização de cada parâmetro foram realizados de igual modo para os diferentes módulos do S1. Como tal, será demonstrado o procedimento de otimização de cada parâmetro do piloto industrial, E1.

O método cromatográfico foi definido tendo em conta o tempo de análise de 16 s e um LD de 2 ng/L.

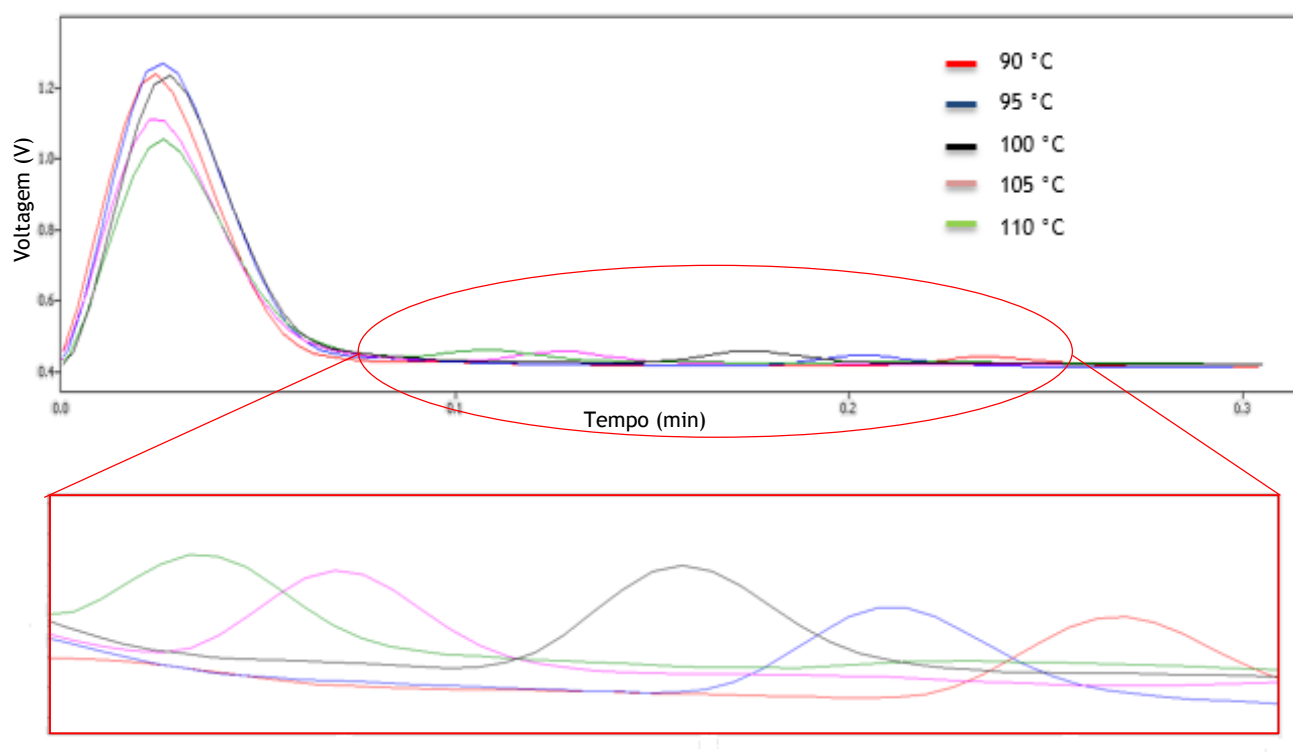
#### 4.1.1 Temperatura das colunas cromatográficas

Sendo um dos parâmetros mais influentes na análise cromatográfica, a temperatura das colunas cromatográficas permite controlar o tempo de retenção e a geometria dos picos de TCA.

O tipo de coluna utilizado é de baixa polaridade, o que permite que ocorra interação entre o TCA, possuindo este afinidade, com a fase estacionária da coluna. O TCA é atraído e retido parcialmente pelas moléculas da fase estacionária, demora mais tempo a percorrer a coluna, separando-se assim dos outros compostos.

Para temperaturas elevadas, a interação entre TCA e fase estacionária da coluna cromatográfica é reduzida, logo a passagem do TCA vai ser mais rápida, o tempo de retenção diminui e há formação de picos mais altos e estreitos, contudo é mais delicada a separação entre picos de diferentes compostos.

A partir de injeções manuais da amostra de uma rolha com TCA numa das colunas cromatográficas, foi testado o efeito da temperatura das colunas em relação ao pico de TCA, variando entre 90 e 110 °C, com intervalos de 5 °C. Os cromatogramas que resultaram de cada teste foram obtidos pelo *software* “Clarity” (Fig. 20).



*Figura 20. Cromatogramas obtidos para valores de temperatura das colunas cromatográficas entre 90 e 110 °C.*

A temperatura de 95 °C é aquela que apresenta áreas de picos de TCA maiores, sem comprometer a separação dos compostos. Isto deve-se ao facto de a temperaturas inferiores, nomeadamente 90 °C o pico de TCA poder não aparecer dentro do tempo de retenção de 16 s e a temperaturas maiores, a proximidade com o pico de oxigénio ser bem mais significativa.

#### 4.1.2 Temperatura do injetor

É necessário que a temperatura do injetor seja superior à temperatura das câmaras de incubação (140 °C), para que não haja condensação da amostra enquanto esta percorre o injetor e, consequentemente, efeito de acumulação de TCA no sistema. Os níveis de deteção e o tempo de análise do TCA não são influenciados por este parâmetro. A temperatura definida para o injetor foi de 150 °C pois a esta temperatura não se observa acumulação de TCA no *transfer-line*.

#### 4.1.3 Temperatura do detetor (ECD)

Para evitar a condensação da amostra na entrada do detetor, a temperatura do ECD deve ser sempre superior à temperatura das colunas. Para o tipo de detetor usado a faixa de temperatura de operação ótima está compreendida entre 180 e 250 °C. Fora deste intervalo o sinal apresenta maiores níveis de ruído dando origem a integrações do ruído de sinal e picos com interferência, causando variações na área de pico integrada. Definiu-se 200 °C como a temperatura de operação do detetor, pois é a temperatura que apresenta melhor definição da área do pico de TCA, como se pode verificar na Fig. 21.

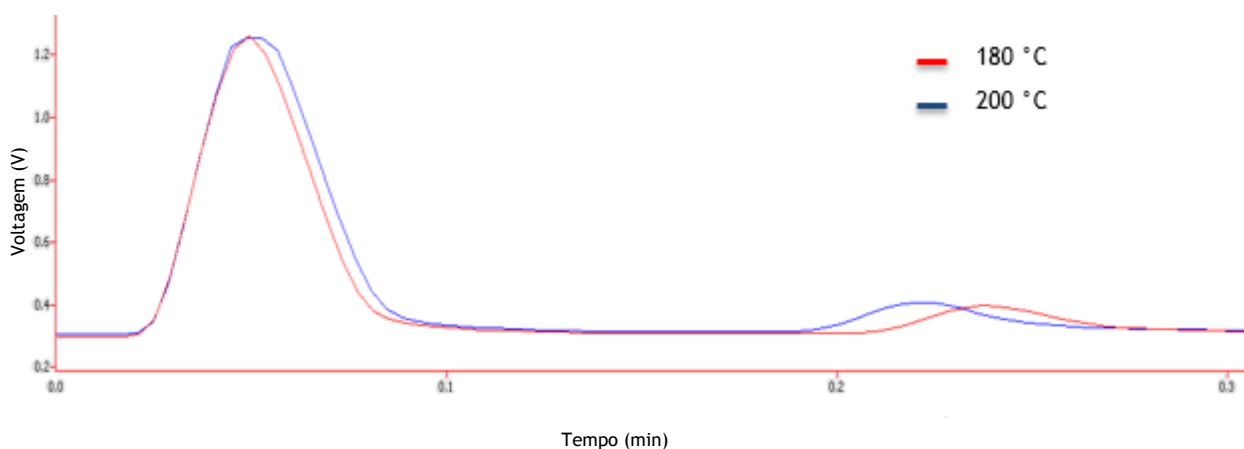


Figura 21. Influência da temperatura do detetor (°C) na área do pico de TCA.

#### 4.1.4 Fluxos de gás de arraste nas colunas cromatográficas

O aumento deste parâmetro diminui o tempo de análise, pois permite uma passagem mais rápida da amostra nas colunas, deslocando o pico de TCA para menores tempos de retenção. A gama de valores dos fluxos de azoto das colunas varia entre 0 a 25 mL/min (0 a 4000 em unidades de *software*), cujo valor máximo não deve ser ultrapassado para evitar danos nas colunas cromatográficas.

É possível que haja diferenças físicas nas 8 colunas cromatográficas, e.g. comprimento, logo é necessário que a otimização do fluxo de azoto em cada uma das colunas crie uma homogeneidade entre elas, para que os resultados sejam coincidentes.

Novamente, foram realizadas injeções de uma amostra com TCA em cada uma das colunas, em que se variou o fluxo de azoto entre 9 e 24,6 mL/min (1500 e 4000). Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Fig. 22.

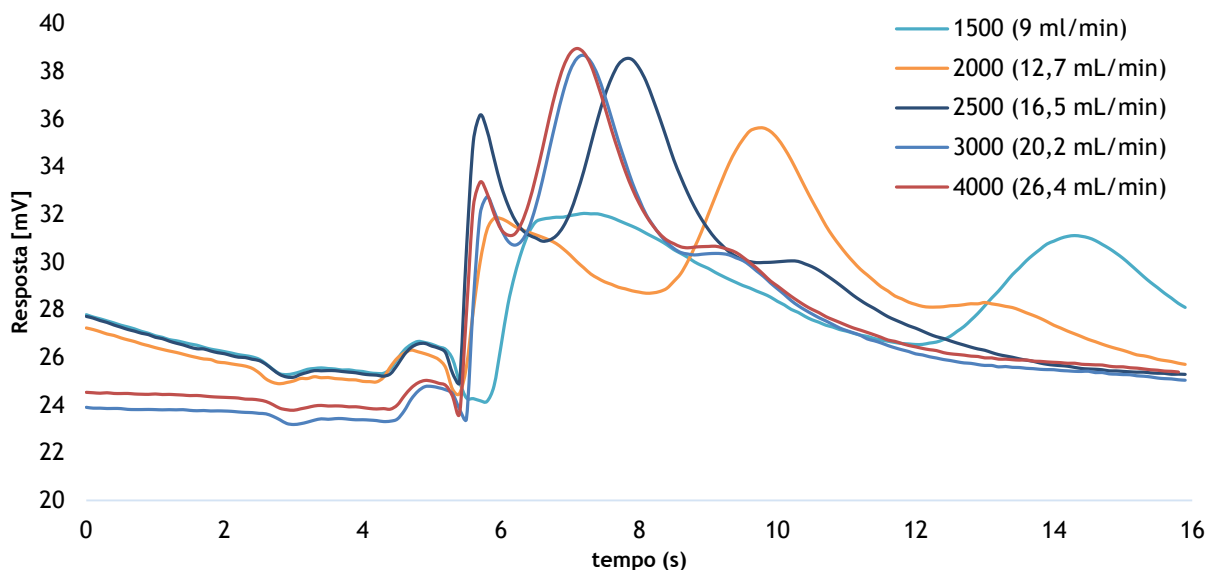


Figura 22. Influência do fluxo de azoto das colunas cromatográficas na análise cromatográfica de TCA.

Analisando o gráfico, verifica-se que para fluxos de azoto inferiores a 1500, o pico de TCA atrasa para tempos de retenção maiores, podendo não aparecer no tempo útil do ciclo de análise. No entanto, para valores superiores a 2500, o pico de TCA aparece próximo do pico de oxigénio. O fluxo ideal de azoto nas colunas está por isso compreendido entre estes dois valores. Como já foi referido, o valor deste parâmetro pode variar de coluna para coluna, dependendo das características físicas de cada, por exemplo, se houver uma coluna cromatográfica com menor comprimento que as restantes, o fluxo de azoto que a percorre vai ser menor. Para além desse fator, este parâmetro tem de ser otimizado de acordo com o parâmetro do *carrier gas* e da temperatura das colunas.

#### 4.1.5 Fluxo de gás de arraste (*Carrier gas*)

Para limpeza da coluna cromatográfica, é usado um fluxo de azoto designado por *carrier gas*. Este fluxo fica ativo imediatamente após a passagem da amostra, de forma a efetuar a limpeza da coluna.

Para valores acima de 13 mL/min (2000), o fluxo de azoto já se torna de tal maneira elevado que altera a temperatura das colunas. Isto porque o azoto alimentado ao equipamento ronda os 20 °C. Para esta gama de valores, há descida de temperatura no interior das colunas, comprometendo a separação dos compostos. Para valores de fluxo inferiores a 9 mL/min (1500), não é garantida a limpeza da coluna.

Os valores de *carrier gas* têm então de estar compreendidos entre 9 e 12,7 mL/min. O valor otimizado para o método cromatográfico foi de aproximadamente 10,4 mL/min (1700).

#### 4.1.6 Fluxo de gás auxiliar - *Make-up*

O fluxo do *make-up* é bastante importante no aumento da sensibilidade do detetor. Este parâmetro otimiza a geometria do pico, tornando-o mais estreito e alto para o mesmo valor de área, e permite uma melhor resolução entre os picos de oxigénio e TCA.

Para estudar o efeito do fluxo do *make-up* mantiveram-se constantes os outros parâmetros, variando apenas o fluxo de azoto entre 0 e 46,1 mL/min (0 a 3500). O fluxo do *make-up* aumenta o fluxo de azoto nas colunas cromatográficas de forma a impulsionar a amostra para o detetor.

O valor mais aceitável para o fluxo de *make-up* é cerca de 30,9 mL/min (2000), pois apresenta um pico mais estreito, comparativamente a outros valores de fluxo (Fig. 23), possibilitando uma melhor integração da área do pico de TCA de amostras com concentrações mais baixas.

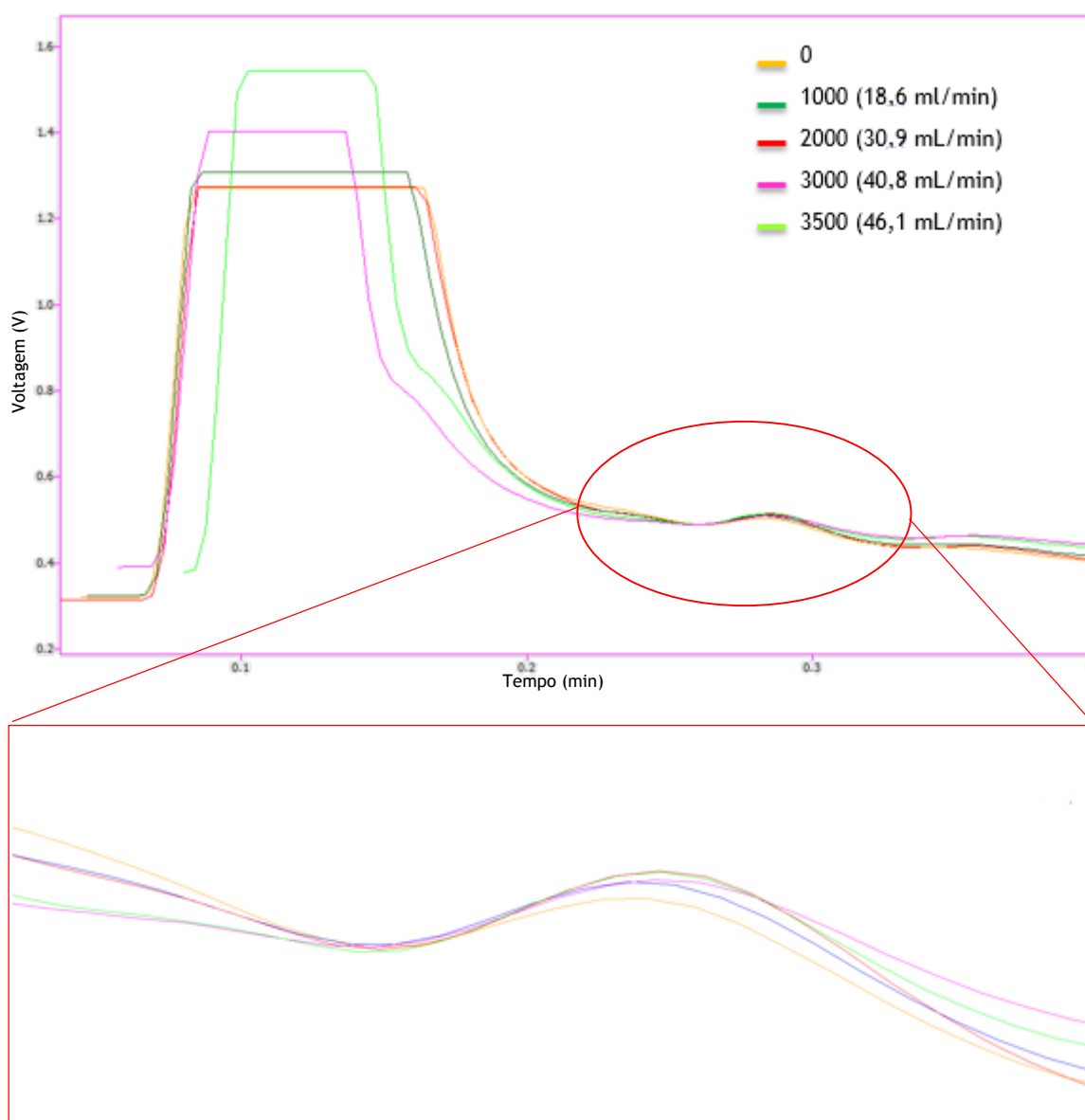


Figura 23. Influência do fluxo de *make-up* na resolução da área do pico de TCA.

#### 4.1.7 Corrente elétrica do ECD

O valor de intensidade de corrente elétrica do ECD vai definir a área do pico e depende do valor de temperatura das colunas cromatográficas e do fluxo do *make-up* do método cromatográfico. O aumento da corrente do ECD aumenta a intensidade da corrente elétrica aplicada no detetor, havendo um maior número de eletrões disponíveis para ionizar as moléculas aquando da sua passagem. Desta forma, o número de iões que atinge o detetor é maior, aumentando a área dos picos formados nos cromatogramas, e consequentemente a sensibilidade da deteção.

Na realização dos testes para determinar o valor de corrente ECD, mantiveram-se os valores de temperatura das colunas cromatográficas (95 °C) e de fluxo *make-up* (2000) constantes, variando os valores da corrente entre 10 e 40 mV, em intervalos de 10 mV. Os cromatogramas obtidos para cada valor de intensidade de corrente estão apresentados na Fig. 24.

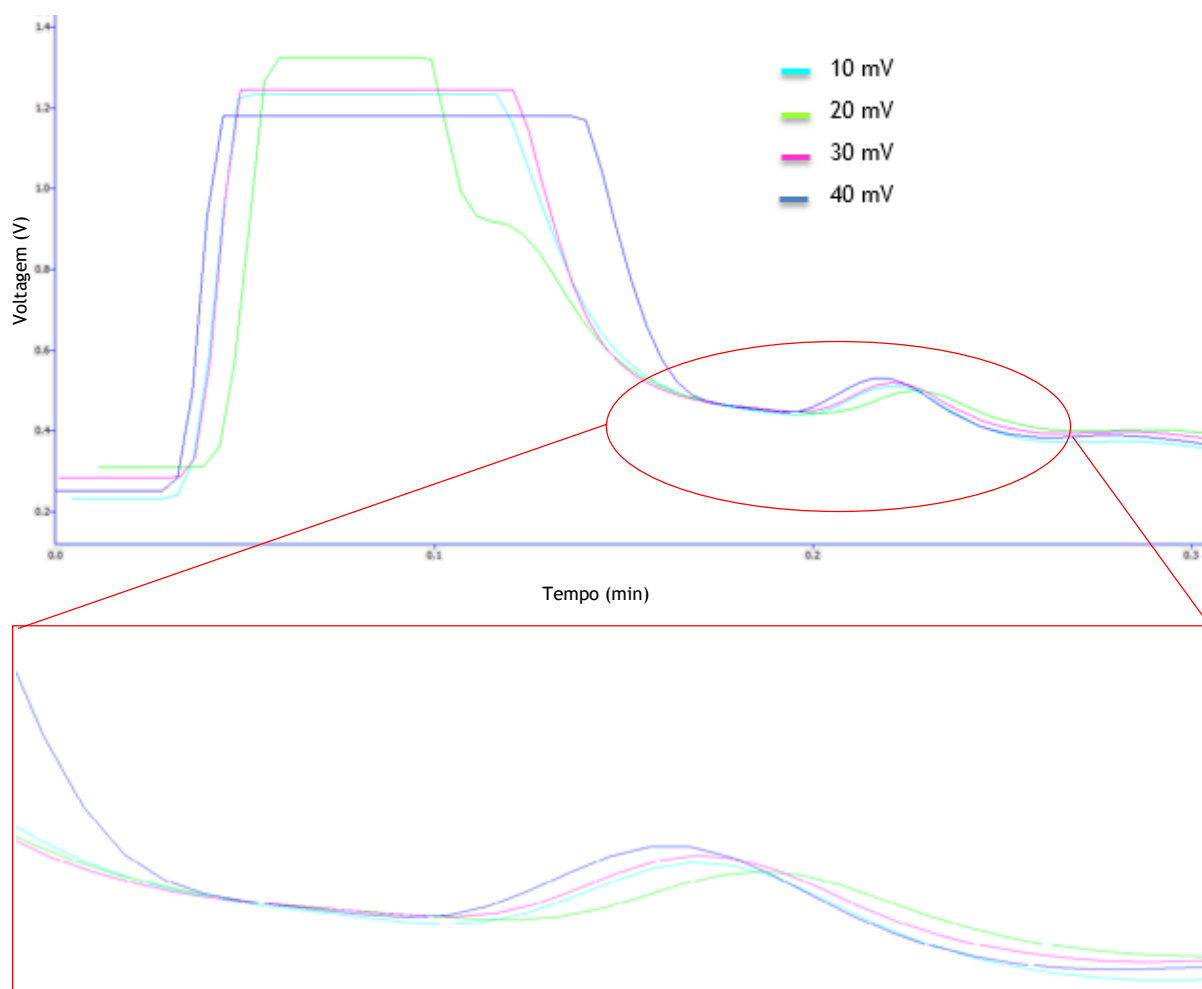


Figura 24. Influência da intensidade da corrente ECD na área do pico de TCA.

Pela análise dos cromatogramas, verifica-se que para 40 mV de corrente, obtém-se uma área do pico de TCA bem mais definida.



#### 4.1.8 Sensibilidade

O parâmetro da sensibilidade influencia a integração da área dos picos presentes num cromatograma. Para que as áreas dos picos provocados pelo ruído de fundo não sejam integradas, é importante definir um valor que permita que o ruído inerente à análise seja excluído da integração. O valor definido para este parâmetro foi de 0,1.

#### 4.1.9 Tempo de injeção

O tempo de injeção é o instante em que a válvula de diafragma altera a sua posição para *inject* durante o ciclo. Este parâmetro influencia o tempo que a amostra da coluna demora a chegar ao detetor e pode ser definido entre 8 e 11 s. Caso se pretenda obter uma análise para menores tempos de retenção, define-se um tempo de injeção menor. Como tal, para tempos de injeção maiores, obtêm-se tempos de retenção maiores. O tempo de injeção definido foi de 9 s.

A afinação deste parâmetro não é crucial para um método de análise de 16 s, porque independentemente do tempo de injeção aplicado, a amostra chega sempre ao detetor dentro do tempo de ciclo.

#### 4.1.10 Heartcut

O *heartcut* é um parâmetro que permite seleccionar qual a porção da amostra que chega ao detetor.

Para o controlo da amostra que chega ao detetor, o sistema tem duas válvulas, uma imediatamente antes da coluna (STF) e outra imediatamente antes do detetor (SC). As válvulas, abrem simultaneamente, não sendo a amostra purgada de oxigénio antes de chegar ao detetor.

Aplicando-se o *heartcut*, a abertura das válvulas é dessincronizada, permitindo a purga da amostra antes de chegar ao detetor. Assim, o pico de TCA deixa de ser afetado pelo pico de oxigénio permitindo uma maior sensibilidade do equipamento para este composto.

Aplicou-se *heartcut* a 0, 1, 2 e 3 s e verificou-se que os níveis de oxigénio diminuem à medida que se aumenta o *heartcut*. De acordo com a Fig. 25, 3 s foi o *heartcut* definido, uma vez que permite a completa purga da amostra - o pico de oxigénio desaparece não afetando a área do pico de TCA.

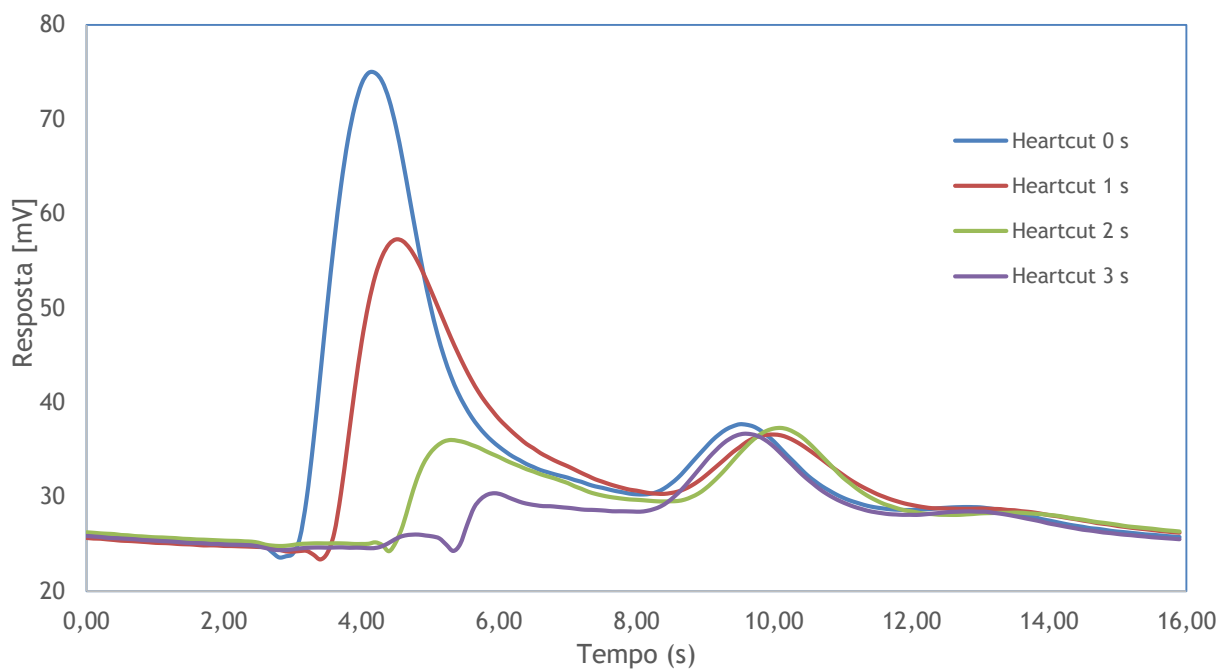


Figura 25. Cromatogramas obtidos para diferentes valores de heartcut.

#### 4.1.11 Otimização do S1

Após a otimização do método cromatográfico do E1, os valores obtidos dos parâmetros experimentais serviram de referência para a otimização do método de análise de cada módulo do S1, contudo tiveram de ser ajustados de acordo com as propriedades físicas de cada componente.

Na Tabela 3 estão apresentadas as condições experimentais de cada parâmetro do método de análise para cada um dos módulos do S1.

**Tabela 3. Parâmetros experimentais dos métodos de análise cromatográfico de cada módulo do S1 (P1 a P6).**

	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Temperaturas das colunas (°C)	90	95	93	92	96	95
Temperatura do detetor (°C)	200	200	200	200	200	200
Temperatura do injetor (°C)	150	150	150	150	150	150
Tempo de injeção (s)	8	8	8	8	8	8
Heartcut (s)	3	3	3	3	3	3
Corrente do ECD (mV)	40	40	40	30	40	40
Fluxo Carrier gas	2000	1771	1690	1700	1701	1700
mL/min	12,7	11,0	10,4	10,4	10,5	10,4
Fluxo Make up	2000	2500	2001	2000	2202	2202
mL/min	30,9	35,8	31,0	30,9	35,9	36,0
Sensibilidade	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Fluxo da coluna 1	2000	1901	1550	1547	2000	2300
mL/min	12,7	12,0	9,0	9,3	12,7	15,0
Fluxo da coluna 2	1500	2000	1599	1999	2000	2299
mL/min	9,0	12,7	9,7	12,7	12,7	15,0
Fluxo da coluna 3	1500	2049	1598	1652	2000	2310
mL/min	9,0	13,1	9,7	10,1	12,7	15,1
Fluxo da coluna 4	4000	2000	1598	1613	2000	2349
mL/min	24,6	12,7	9,7	9,8	12,7	15,4
Fluxo da coluna 5	1000	2001	1689	1507	2000	2336
mL/min	5,2	12,7	10,5	9,0	12,7	15,3
Fluxo da coluna 6	2000	2149	1537	1497	2500	2270
mL/min	12,7	13,8	9,3	9,0	16,5	14,6
Fluxo da coluna 7	1300	2011	1558	2299	2000	2220
mL/min	7,5	12,8	9,4	15,0	12,7	14,4
Fluxo da coluna 8	1500	1919	1769	1499	2000	2190
mL/min	9,0	12,1	10,5	9,0	12,7	14,2

## 4.2 Validação do sistema de deteção individual S1

A validação do S1 tem como objetivo determinar o LD conseguido após otimização do método cromatográfico, isto é, o limite a partir do qual a deteção do equipamento é total.

Para a validação do S1 utilizou-se um conjunto de 200 rolhas com concentração de TCA previamente conhecida, quantificadas por SPME-GC-ECD. Este grupo de rolhas foi analisado em cada um dos módulos do S1 para verificar a fiabilidade do sistema e a repetibilidade de resultados entre os módulos.

As rolhas foram analisadas diretamente nos módulos do S1, seguindo o processo de análise anteriormente descrito, sendo no final classificadas pelo equipamento como positivas ou negativas. Os resultados obtidos de cada módulo estão apresentados no Anexo 3.

Calculou-se a eficiência de deteção do S1 para quatro gamas diferentes de concentração de TCA:  $\geq 10$  ng/L; 2 a 10 ng/L; 0,5 a 2 ng/L e  $< 0,5$  ng/L (não detetável - n.d.). Na Tabela 4 estão apresentados o número de rolhas analisadas de cada gama de concentração de TCA e a respetiva percentagem de deteção, para cada módulo do S1 (P2, P3, P4 e P6).

Tabela 4. Resultados obtidos da validação do S1.

		P2	P3	P4	P6
TCA $\geq 10$ ng/L	Nº rolhas total	47	47	47	47
	Nº rolhas detetadas	47	46	46	46
	Eficácia (%)	100	97,9	97,9	97,9
2 $\leq$ TCA < 10 ng/L	Nº rolhas total	55	55	55	55
	Nº rolhas detetadas	46	45	47	49
	Eficácia (%)	83,7	81,8	85,5	89,1
TCA $\geq 2$ ng/L	Nº rolhas total	102	102	102	102
	Nº rolhas detetadas	93	91	93	95
	Eficácia (%)	91,2	89,2	91,2	93,1
0,5 < TCA < 2 ng/L	Nº rolhas total	25	25	25	25
	Nº rolhas detetadas	7	8	18	14
	Eficácia (%)	28	32	72	56
TCA < 0,5 (n.d.)	Nº rolhas total	45	45	45	45
	Nº rolhas detetadas	4	12	20	6
	Eficácia (%)	9	27	44	13

O número de rolhas analisado variou de módulo para módulo. Isto porque durante a validação de cada módulo houve rolhas que ficaram encravadas no sistema de alimentação do equipamento que ainda se encontrava em alterações durante o processo, pelo que algumas rolhas ficaram deformadas e tiveram de ser excluídas dos testes dos módulos seguintes. Desta forma, e de maneira a obter uma repetibilidade fiável entre os módulos, só foram consideradas as rolhas que foram analisadas em todos os módulos, excluindo-se dos cálculos rolhas que foram deformadas entre análises.

Pela observação da Tabela 4, é possível verificar que a eficácia de deteção dos módulos para rolhas com concentração de TCA superior a 10 ng/L varia entre os 97 e os 100 %. A rolha nº 55, com concentração 11,4 ng/L, não foi detetada por 3 dos módulos, pelo que será reanalisada por SPME-GC-ECD para confirmação do resultado da concentração de TCA.

Para rolhas com concentrações superiores a 2 ng/L, a eficácia de deteção varia entre 90 e 93 %. Para a gama de concentração de TCA entre 2 e 10 ng/L houve uma redução da eficácia de deteção para 80 a 90 %, dependendo dos módulos. Todas as rolhas com concentração superior a 2 ng/L que não foram detetadas pelo equipamento serão reanalisadas por SPME-GC-ECD. Até à data de fecho desta dissertação não foi possível obter os resultados da maceração individual, no entanto, dado o elevado número de rolhas não detetadas neste intervalo, parece indicar que o sistema ainda não apresenta uma eficácia de deteção de 100 % em rolhas com concentração superior a 2 ng/L.

A percentagem de concentrações não detetáveis de TCA corresponde à percentagem de “falsos positivos” que a máquina deteta, ou seja, rolhas que são consideradas positivas pelo equipamento, mas que contém concentrações de TCA inferiores a 0,5 ng/L, e que deveriam ser classificadas como negativas. Como se pode verificar pelos resultados obtidos da Tabela 4, esta percentagem é bastante superior nos módulos P3 e P4, pelo que é necessário regular o valor de rejeição neste módulo.

Por outro lado, o módulo P6 é o que apresenta uma maior eficácia comparativamente aos restantes módulos, pois é o que apresenta percentagens de deteção superiores para concentrações de TCA acima de 2 ng/L e menor percentagem de deteção de “falsos positivos”.

Estes resultados demonstram que é ainda necessário ajustar os valores dos parâmetros do método cromatográfico para se conseguir alcançar uma eficácia de deteção de concentrações de TCA superiores a 2 ng/L de 100% e diminuir a percentagem de “falsos positivos”. Enquanto que para a diminuição de percentagem de falsos positivos uma redefinição do valor mínimo de rejeição poderá fazer a diferença, para garantir a eficácia total de TCA acima de 2 ng/L terá se se aumentar a sensibilidade do sistema. É possível que se tenha que otimizar com maior detalhe o fluxo de *make-up* do detetor em picos com área de concentração de TCA menor.

Os métodos cromatográficos obtidos permitiram a obtenção de uma eficácia de deteção superior a 90 % em todos os módulos otimizados, constituindo uma eficácia global do S1 de 91,2 %.

## 5 Conclusões

Na primeira fase do projeto foi otimizado o método cromatográfico do piloto industrial E1, obtendo-se um método de análise com limite de deteção de concentração de TCA de 2 ng/L e tempo de análise de 16 s. Os testes realizados permitiram otimizar os seguintes parâmetros: temperatura das colunas cromatográficas, temperatura do detetor, temperatura do injetor, fluxo das colunas cromatográficas, fluxo *carrier gas*, fluxo auxiliar *make-up*, intensidade da corrente ECD, sensibilidade, tempo de injeção e *heartcut*. A inclusão deste último parâmetro experimental no método cromatográfico permitiu uma diminuição da intensidade do pico de oxigénio, aumentando a sensibilidade do detetor para concentrações de TCA mais baixas.

Os valores obtidos da otimização de cada parâmetro experimental da análise cromatográfica do E1 serviram de referência para calibrar o método de análise de cada módulo do S1. Depois da calibração deste equipamento e deste ser complementado com um sistema de alimentação e saída de rolhas de cortiça natural, o equipamento encontra-se preparado para operar autonomamente, prosseguindo-se para a segunda fase do projeto: validação da eficácia do S1 na deteção de TCA. Devido a problemas numa das válvulas do módulo P1 e à impossibilidade de obter os resultados da validação do módulo P5, foram validados apenas 4 módulos do S1.

As rolhas naturais usadas para a validação do método foram previamente maceradas e analisadas por SPME-GC-ECD, no I&D, e as concentrações de TCA foram divididas em diferentes gamas. Os resultados obtidos foram promissores, obtendo-se uma eficácia de deteção para concentrações de TCA superiores a 2 ng/L de 91,2 %, 85,2 %, 91,2 % e 93,1 %, nos módulos P2, P3, P4 e P6, respetivamente.

Como o objetivo final é a inserção do equipamento no processo de produção de rolhas naturais é necessário ajustar os parâmetros experimentais do método cromatográfico, de maneira a aumentar a eficácia global do sistema de 91,2 % para 100 % na deteção de concentrações de TCA superiores a 2 ng/L.

## 5.1 Outros Trabalhos Realizados

Durante o estágio curricular, foi acompanhada a rotina diária do laboratório de I&D da Amorim & Irmãos, S.A. para a análise de TCA em rolhas de cortiça natural.

No seguimento de um projeto de dissertação que teve início em 2013 e que tem a duração de 2 anos, recolheram-se resultados para verificar a eficácia da MDI em termos da deteção de TCA nas rolhas de cortiça natural e, conseqüentemente, o risco de contaminação de TCA dessas mesmas rolhas para o vinho, após 1 ano de engarrafamento.

Paralelamente e em lotes de clientes, foi acompanhada a rotina da análise de TCA em rolhas de cortiça natural na MDI.

### 5.1.1 Validação da MDI na deteção individual de TCA em rolhas de cortiça natural

O objetivo deste ensaio, que teve início em Outubro de 2013, é verificar a eficácia da MDI na deteção de TCA em termos de riscos de contaminação para o vinho, verificando se todas as rolhas detetadas como positivas (concentração igual ou superior a 5 ng/L) e negativas (concentração inferior a 5 ng/L) contaminaram ou não o vinho.

Para validar a eficácia da MDI, efetuam-se análises sensoriais e por SPME-GC-MS ao vinho engarrafado, e análises por SPME-GC-ECD às rolhas respetivas, após diferentes períodos de tempo, *e.g.* 1 mês, 2 meses (Figueiredo, 2014). No presente trabalho, fizeram-se as análises após um ano de engarrafamento, tendo-se seguido o procedimento descrito em Figueiredo, 2014.

#### 5.1.1.1 Análise do vinho após 1 ano de engarrafamento

Para ser possível comparar os três períodos já analisados, nas Fig. 26, 27 e 28 estão representados os resultados obtidos por SPME-GC-MS no primeiro, segundo e décimo segundo mês de engarrafamento, respetivamente (Figueiredo, 2014).

No terceiro ponto de análise, as provas sensoriais das amostras de vinho foram realizadas por 7 provadores, para as rolhas consideradas negativas, e 5 provadores, para as rolhas consideradas positivas. Os resultados obtidos das análises SPME-GC-MS e sensoriais efetuadas às amostras de vinho e os resultados das respetivas rolhas de cortiça natural analisadas por SPME-GC-ECD encontram-se no Anexo 4.



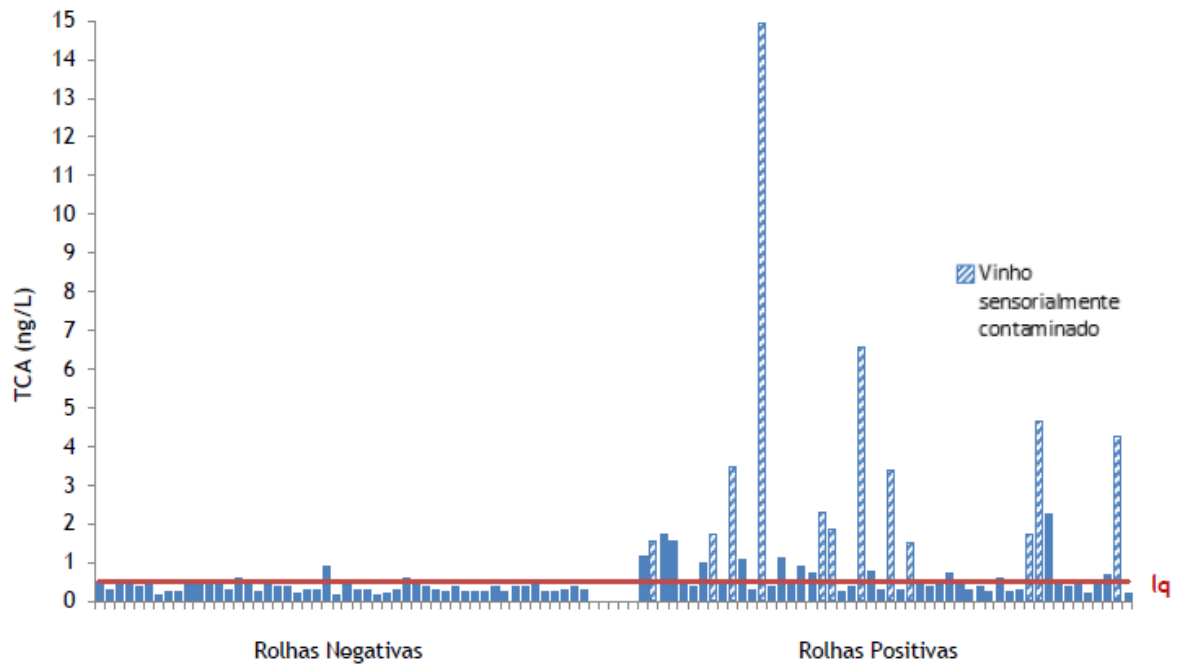


Figura 26. Concentração de TCA (ng/L) em vinhos analisados após 1 mês de engarrafamento, em que “lq” corresponde ao limite de quantificação de TCA (0,5 ng/L) do método SPME-GC-MS (Figueiredo, 2014).

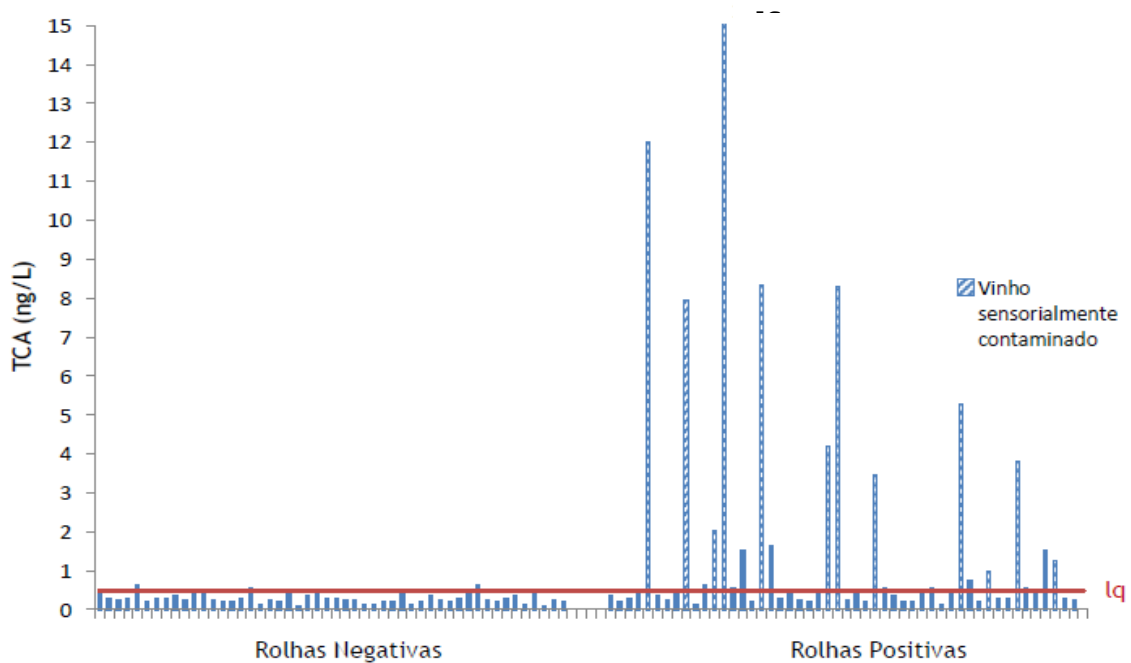


Figura 27. Concentração de TCA (ng/L) em vinhos analisados após 2 meses de engarrafamento, em que “lq” corresponde ao limite de quantificação de TCA (0,5 ng/L) do método SPME-GC-MS (Figueiredo, 2014).

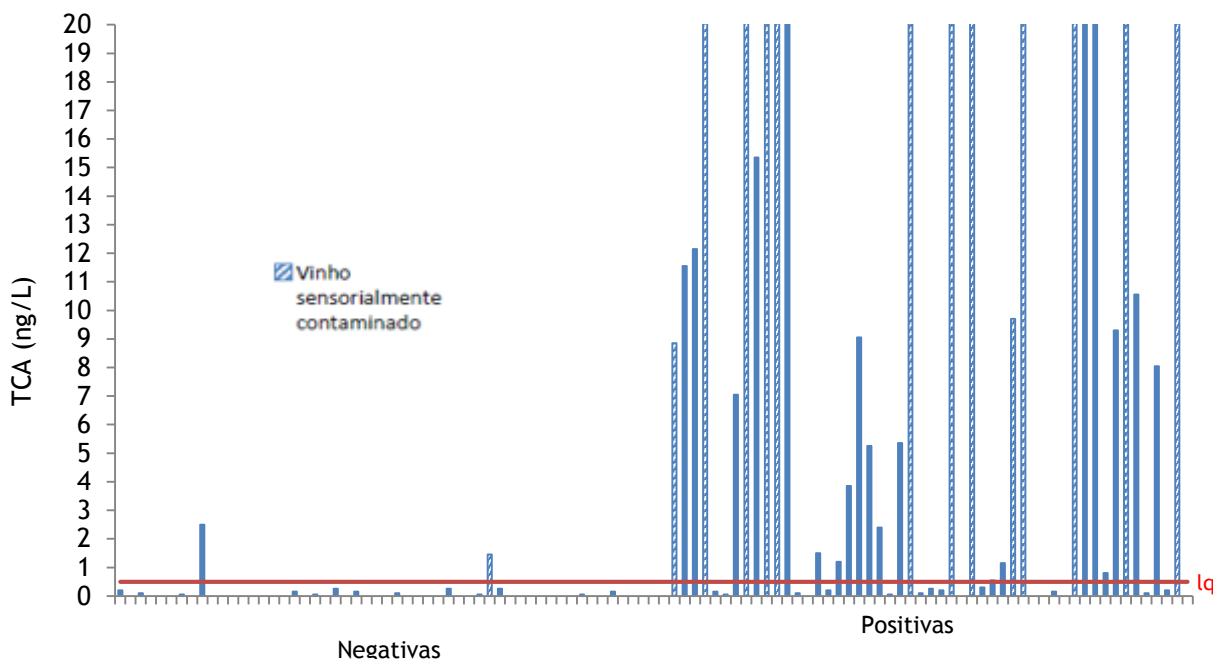


Figura 28. Concentração de TCA nos vinhos analisados após 1 ano de engarrafamento, em que “lq” corresponde ao limite de quantificação de TCA (0,5 ng/L) do método SPME-GC-MS

Verificou-se então que, tanto no primeiro como no segundo mês de engarrafamento, apenas 3 vinhos vedados com rolhas negativas apresentaram valores superiores ao limite de quantificação, sendo no entanto esses valores inferiores a 1 ng/L. Contudo, nenhum dos vinhos foi considerado sensorialmente contaminado. Em relação aos vinhos engarrafados com rolhas positivas, durante o primeiro mês, 26 vinhos encontravam-se contaminados com TCA, dos quais 12 foram considerados sensorialmente afetados, e após segundo mês de engarrafamento também foram encontrados 12 vinhos afetados sensorialmente por TCA, dos 22 vinhos detetados contaminados, por SPME-GC-MS.

Relativamente ao terceiro ponto de análise, analisando os dados relativos aos vinhos engarrafados com rolhas negativas, verificou-se que apenas 2 amostras de vinho apresentavam-se contaminadas com TCA, e dessas amostras, apenas uma foi sensorialmente contaminada, cuja concentração de TCA presente no vinho era de 1,5 ng/L. Em relação aos vinhos engarrafados com rolhas positivas, 33 amostras foram contaminadas com TCA, no entanto apenas 13 foram sensorialmente contaminados, em que os valores de TCA detetados nos vinhos variavam entre 8,9 e 142,1 ng/L.

Os resultados do terceiro ponto de análise corroboram os resultados obtidos no estudo dos pontos de análise anteriores, não existindo correlação entre TCA nas rolhas e o respetivo valor de TCA nos vinhos. Os resultados de TCA nas amostras de vinho, após um ano de engarrafamento, representados na Tabela 5, permitiram confirmar a eficácia da deteção de

TCA através da MDI, tendo-se verificado que as rolhas aceites pela MDI, isto é, com valores de TCA inferiores a 5 ng/L, não provocaram contaminação de forma significativa nas respetivas amostras de vinho. Relativamente às amostras de vinhos vedados com rolhas rejeitadas pela MDI, 66 % destas estavam contaminadas com TCA, em que 40 % apresentaram alterações organoléticas.

*Tabela 5. Gamas de concentração de TCA obtidas nas amostras de vinho analisadas após 1 ano de engarrafamento.*

Gama de TCA (ng/L)	nd	[0,5; 1]	[1, 2]	[2, 5]	> 5
<b>Negativas</b>	48	0	1	1	0
(%)	96	0	2	2	0
<b>Positivas</b>	17	2	3	2	26
(%)	34	4	6	4	52

## 5.2 Trabalho futuro

Neste momento procede-se à validação do módulo P5 e, depois de se substituir a válvula STF, será possível efetuar a sua validação do módulo P1. Irá ser necessário realizar afinações no método cromatográfico nos módulos do S1 já validados para garantir uma eficácia de 100 % na deteção de rolhas naturais com concentrações iguais ou superiores a 2 ng/L, de modo a que o equipamento S1 fique operacional e seja inserido no processo de produção de rolhas de cortiça natural.

A fase seguinte será incluir no E1 dois sistemas distintos que irão possibilitar a redução do tempo de incubação de 5 para 2 minutos e do limite mínimo de deteção de TCA para 0,5 ng/L. Após a realização destas intervenções e das otimizações necessárias ao novo método de análise, estes novos sistemas serão incluídos em cada módulo do S1.

## 6 Referências

- Corticeira Amorim. *Relatório de Contas consolidadas 1S14 e 2T14*, [[http://www.amorim.com/xms/files/Investidores/6\\_Resultados/CASGPSRC1S2014PT.pdf](http://www.amorim.com/xms/files/Investidores/6_Resultados/CASGPSRC1S2014PT.pdf)], Julho de 2014. Acedido em Janeiro de 2014.
- Corticeira Amorim. *Relatório de Contas Consolidadas (não auditadas) 9M14 e 3T14*, [[http://www.amorim.com/xms/files/Investidores/6\\_Resultados/CASGPS20143TPT.pdf](http://www.amorim.com/xms/files/Investidores/6_Resultados/CASGPS20143TPT.pdf)], Outubro de 2014. Acedido em Janeiro de 2014.
- Afonso, J.. *A Rolha*, [<http://www.revistadevinhos.pt/artigos/show.aspx?secção=segredos-do-vinho&artigo=10591&title=a-rolha&idioma=pt>], Revista de Vinhos, 11 de Fevereiro 2009. Acedido em Novembro de 2014.
- The Cork Quality Council. *Current results from screening of incoming cork shipments show an 93% reduction in detectable TCA*, [<http://www.corkqc.com/newsandpress/cnews2.htm>], Cork Quality Council, 2014. Acedido em Novembro de 2014.
- APCOR. *O combate ao 2,4,6-tricloroanisol (TCA)*, [[http://www.ciencia20.up.pt/attachments/article/577/rec\\_5TCA.pdf](http://www.ciencia20.up.pt/attachments/article/577/rec_5TCA.pdf)], Manual técnico de rolhas, 19-26, 9 de Julho de 2011. Acedido em Setembro de 2014.
- Amorim Cork. *Ciência e tecnologia ao serviço da Natureza*, [<http://www.amorimcork.com/pt/products/quality-and-rd/>], Amorim, 2014. Acedido em Setembro de 2014.
- Cabral, M.. *Interação das rolhas de cortiça com os vinhos*, [<http://www.cvrtejo.pt/dlds/ApresentaoCNEMA14062013.pdf>], Amorim & Irmãos S.A., Junho de 2013. Acedido em Novembro de 2014.
- C.E. Liège. *Código Internacional das Práticas Rolheiras*. European Cork Federation, Versão 6.03. 2011.
- Cork Supply. *Innocork*, [<http://www.corksupply.com/commitment-quality/innocork.aspx>]. Acedido em Outubro de 2014.
- Fortes, *et al.*. *A Cortiça*. Instituto Superior Técnico, Portugal, 2004.
- Coque, J. J. R., *et al.*. *Wine contamination by Haloanisoles*. Instituto de Biotecnologia de Liòn, 2006.
- Capone, D. L., Skouroumounis, e Sefton, M. A.. *Permeation of 2,4,6-trichloroanisole through cork closures in wine bottles*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 8, 196-199, 2002.

- Skoog, Douglas A. *et al.*. *Principals of Instrumental Analysis*, 6<sup>th</sup> edition. Thomson Brooks/Cole, 795-796, 2007.
- Hervé *et al.*. *Chemical analysis of TCA as a quality control tool for natural cork*. ETS Laboratories, 2004.
- Sefton *et al.*. *Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine*. Australian Journal of Grape and Wine Research 11, 226-240, 2005.
- Sefton, *et al.*. *Origin and fate of 2,4,6-Trichloroanisole (TCA) in cork bark and wine corks*, Australian Journal of Grape and Wine Research 13, 106-166, 2007.
- Vasconcelos, B.. *Migração de 2,4,6-TCA através de rolhas Neutrocork para um vinho e implementação do método de análise para MDMP*. Tese de Mestrado em Engenharia Alminetar, Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, Porto, 2012.
- Pereira, P.. *Novos métodos rápidos para a quantificação de 2, 4, 6 - Tricloroanisol*. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal, 2012
- Costa. C.. *Otimização de equipamento industrial para a quantificação de 2, 4, 6 - Tricloroanisol*. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal, 2012
- Figueiredo, F.. *2,4,6-Tricloroanisol em rolhas de cortiça natural: eficácia do equipamento de deteção individual na prevenção da contaminação de vinhos*. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal, 2014
- Silva, A.. *Novos desenvolvimentos na deteção individual de 2,4,6-Tricloroanisol em rolhas de cortiça*. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal, 2014.



## Anexo 1      Análise por SPME-GC-ECD

### Equipamento

- *Autosampler CTC Analytics Combi-PAL*: responsável pelo tratamento da amostra até ao cromatógrafo. Constituído por um suporte de 2 *trays* onde são colocados os tubos cromatográficos com as respetivas amostras, e um braço mecânico, responsável pelo transporte da amostra do *tray* para a incubadora, com uma fibra exposta ao *headspace* para extrair os compostos voláteis.
- *Cromatógrafo Varian CP-3800*: responsável pela análise da amostra. Constituído por um injetor, onde a fibra dessorve termicamente os compostos, uma coluna cromatográfica de fraca polaridade e um detetor de captura eletrónica (ECD).

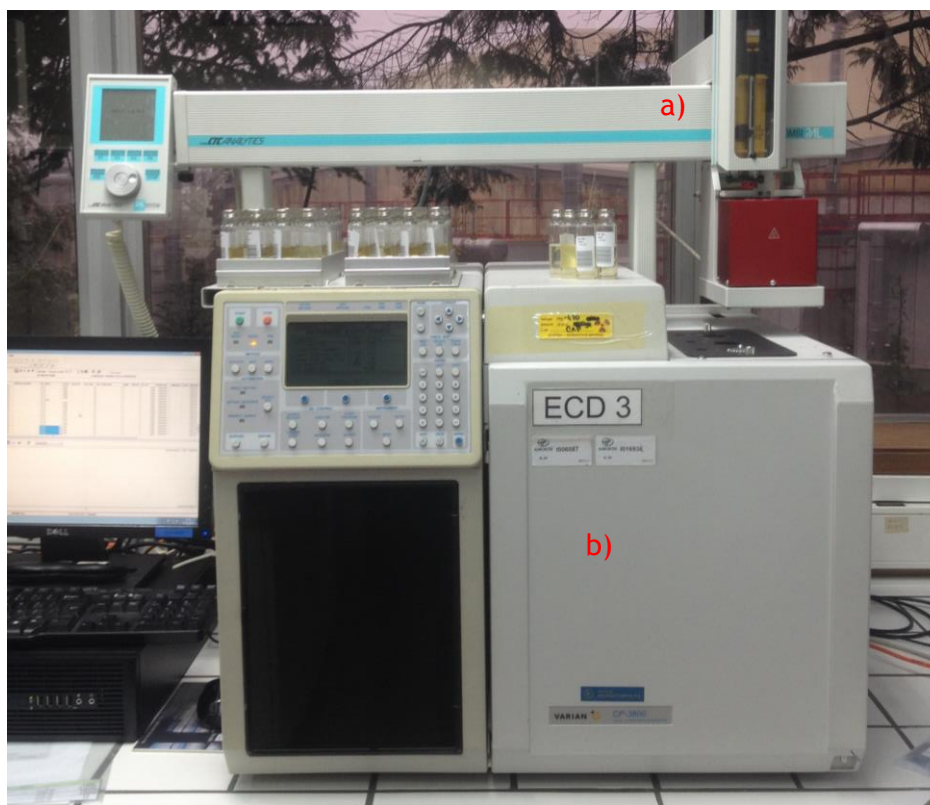


Figura 29. Equipamento de análise por SPME-GC-ECD: a) autosampler; b) cromatógrafo.

Tabela 6. Condições experimentais do método de análise de TCA por SPME-GC-ECD, no I&amp;D.

Extração em fase sólida		Fase de separação e detecção			
Tempo de incubação	2 min	Tempo de dessorção em <i>splitness</i>	4 min	Programa de temperaturas do TCA	
Temperatura	50 °C	Temperatura do injetor	270 °C	Temperatura inicial	90 °C
Velocidade de rotação	250 rpm	Razão de <i>split</i>	20	Temperatura final	265 °C
Tempo de adsorção	8 min	<i>Glass liner</i>	<i>Varian</i>	Incremento de temperatura	15 °C/min
Fibra	PDMS, 100 µm	Coluna Cromatográfica	Teknokroma TRB-5MS, 30 m x 0,25 mm	Tempo do patamar final a 265 °C	20 s
		Gás de arraste	Hélio	Tempo total	12 min
		Fluxo total de gás	28 mL/min		
		Fluxo de gás na coluna	1 mL/min		
		Temperatura do detetor	280 °C		
		Gás de limpeza	Azoto		



## Anexo 2 Características das colunas cromatográficas - S1

Tipo de coluna: Phenomex ZB-5HT Inferno

Gama de temperaturas: -60 °C a 430°C

Material: colunas não metálicas estáveis até 430 °C

Revestimento: Resina de poliamida

Condições operatórias favoráveis:

- Baixa polaridade
- Elevada estabilidade
- Gama alargada de temperaturas
- Baixo sangramento

## Anexo 3 Resultados da Validação do S1

Na tabela estão apresentados os valores obtidos da concentração de TCA presente nas 172 rolhas de cortiça natural, pelo método de rotina (SPME-GC-ECD), usadas no processo de validação do S1, e os respetivos resultados da deteção individual em cada módulo do S1 (P2, P3, P4 e P6). As rolhas consideradas positivas (+) apresentavam um pico superior a 0,1 mV/s.

*Tabela 7. Resultados da deteção de rolhas naturais com concentrações previamente conhecidas em quatro módulos do S1.*

Rolha	TCA (ng/L) SPME-GC-ECD	Sistema de deteção individual de TCA em rolhas de cortiça natural - S1			
		P2	P3	P4	P6
1	2,2	+	+	+	-
2	n.d.	-	-	-	-
3	1,0	+	-	+	-
4	n.d.	-	-	-	-
5	5,5	+	+	+	+
6	n.d.	-	+	+	-
7	n.d.	-	-	-	-
8	n.d.	-	-	-	-
9	2,4	+	+	+	+
10	6,1	+	+	+	+
11	17,5	+	+	+	+
12	0,8	-	-	-	-
13	30,3	+	+	+	+
14	2,8	+	+	+	-
15	39,7	+	+	+	+
16	n.d.	-	-	+	-
17	n.d.	+	-	-	-
18	n.d.	-	-	-	-
19	1,6	-	+	+	+
20	1,7	-	+	+	+
21	4,3	+	+	+	+
22	70,0	+	+	+	+
23	n.d.	-	-	-	-
24	73,0	+	+	+	+
25	n.d.	-	+	+	-
26	17,0	+	+	+	+
27	0,9	-	-	+	+
28	10,0	+	+	+	+
29	5,5	+	+	+	+
30	n.d.	-	+	+	-
31	1,6	-	-	+	-
32	0,6	-	-	-	-

33	37,3	+	+	+	+
34	5,7	-	+	+	-
35	5,9	+	+	+	+
36	5,7	-	+	+	+
37	41,9	+	+	+	+
38	n.d.	-	-	+	-
39	n.d.	-	-	-	-
40	1,7	-	+	-	+
41	1,7	-	-	+	+
42	44,0	+	+	+	+
43	14,7	+	+	+	+
44	11,4	+	+	+	+
45	111,3	+	+	+	+
46	4,5	+	+	+	+
47	4,2	+	+	+	+
48	5,1	+	+	+	+
49	13,0	+	+	+	+
50	80,7	+	+	+	+
51	n.d.	-	-	-	+
52	n.d.	-	-	+	+
53	n.d.	-	-	-	+
54	6,6	+	-	-	+
55	11,4	+	-	-	-
56	5,7	+	-	-	+
57	n.d.	-	-	-	-
58	n.d.	-	-	-	-
59	1,0	-	-	+	+
60	60,1	+	+	+	+
61	6,4	+	+	+	+
62	1,6	-	-	-	+
63	12,1	+	+	+	+
64	66,2	+	+	+	+
65	n.d.	-	-	+	-
66	13,8	+	+	+	+
67	6,8	+	+	+	+
68	n.d.	-	-	+	-
69	11,5	+	+	+	+
70	n.d.	-	-	+	-
71	66,2	+	+	+	+
72	20,8	+	+	+	+
73	n.d.	-	-	-	-
74	5,2	+	+	+	+
75	n.d.	-	+	+	+
76	3,4	+	+	-	+
77	n.d.	-	+	+	+
78	1,4	+	+	+	-
79	1,1	-	+	+	+

80	16,9	+	+	+	+
81	5,9	+	+	+	+
82	7,2	+	+	+	+
83	25,0	+	+	+	+
84	350,4	+	+	+	+
85	13,0	+	+	+	+
86	9,1	+	+	+	+
87	4,9	+	+	-	+
88	7,1	+	-	-	+
89	120,0	+	+	+	+
90	100,0	+	+	+	+
91	1,1	-	-	+	+
92	0,8	-	+	+	+
93	n.d.	-	+	+	+
94	n.d.	-	-	+	-
95	n.d.	+	-	-	-
96	n.d.	-	+	+	-
97	27,7	+	+	+	+
98	6,1	+	+	+	+
99	2,5	-	-	-	+
100	n.d.	-	-	-	-
101	n.d.	-	-	-	-
102	70,5	+	+	+	+
103	7,1	+	-	-	+
104	64,0	+	+	+	+
105	n.d.	+	-	+	-
106	7,2	+	+	+	+
107	4,0	-	+	+	+
108	2,6	-	+	+	-
109	1,6	-	-	+	+
110	n.d.	-	+	+	-
111	n.d.	-	-	+	-
112	18,4	+	+	+	+
113	7,1	+	+	+	+
114	n.d.	-	-	-	-
115	n.d.	-	+	+	-
116	1,2	+	+	+	-
117	5,5	+	+	+	+
118	1,5	-	-	-	+
119	5,6	+	+	+	+
120	9,4	-	+	+	-
121	n.d.	-	+	-	-
122	3,8	+	+	+	+
123	0,6	+	-	-	-
124	14,8	+	+	+	+
125	0,8	+	-	+	+
126	51,0	+	+	+	+

127	n.d.	-	-	-	-
128	1,8	+	-	+	+
129	n.d.	-	-	+	-
130	6,5	+	+	+	+
131	11,2	+	+	+	+
132	1,4	-	-	+	-
133	3,7	+	+	+	+
134	0,9	-	+	+	-
135	5,5	+	-	+	+
136	2,4	+	-	-	+
137	4,3	+	+	+	+
138	14,9	+	+	+	+
139	32,0	+	+	+	+
140	1,5	+	-	+	-
141	2,8	-	+	+	+
142	18,9	+	+	+	+
143	n.d.	-	+	-	-
144	6,2	+	+	+	+
145	8,2	+	+	+	+
146	91,0	+	+	+	+
147	5,4	+	+	+	+
148	39,0	+	+	+	+
149	19,6	+	+	+	+
150	11,0	+	+	+	+
151	1,1	-	-	-	-
152	n.d.	-	-	+	-
153	7,1	+	-	+	+
154	5,8	+	+	+	+
155	n.d.	+	-	-	-
156	n.d.	-	-	+	-
157	20,4	+	+	+	+
158	20,0	+	+	+	+
159	13,2	+	+	+	+
160	6,5	+	+	+	+
161	9,8	+	+	+	+
162	n.d.	+	+	-	-
163	3,8	+	+	+	+
164	n.d.	+	+	+	+
165	n.d.	-	-	-	-
166	7,0	+	+	+	+
167	2,3	-	+	+	+
168	3,3	+	+	+	+
169	2,0	-	+	+	+
170	2,4	-	-	+	+
171	3,3	+	+	+	-
172	11,1	+	-	+	+

## Anexo 4 Resultados obtidos da análise após um ano de engarrafamento

Os resultados obtidos da análise após um ano de engarrafamento para as rolhas negativas e positivas estão apresentados na Tabela 8 e 9, respetivamente.

Nas análises sensoriais, os resultados discriminados com “TCA” correspondem aos vinhos considerados sensorialmente contaminados por mais de 50 % dos provadores.

- Rolhas negativas

Produto: Rolhas de cortiça natural 45x24 Classe Extra  
 Quantidade: 50  
 Metodologia: Análise química e sensorial do vinho após 12 meses de engarrafamento  
 Data: 13-10-2014

*Tabela 8. Resultados de TCA em amostras de vinho, após 1 ano de engarrafamento, vedado com rolhas consideradas negativas pela MDI.*

Amostra	TCA (ng/L) vinho (SPME-GC-MS)			TCA (ng/L) rolha	Análise sensorial (Painel de Provadores)							Resultado		
	(1ª)	(2ª)	Média		1	2	3	4	5	6	7		TCA (%)	
1	0,0	0,4	0,2	n.d.									0,0	n.d.
2	0,0	0,0	0,0	0,5									0,0	n.d.
3	0,2	0,0	0,1	n.d.									0,0	n.d.
4	0,0	0,0	0,0	n.d.									0,0	n.d.
5	0,0	0,0	0,0	n.d.									0,0	n.d.

6	0,0	0,0	0,0	n.d.			0,0	n.d.
7	0,0	0,1	0,1	0,5			0,0	n.d.
8	0,0	0,0	0,0	0,5			0,0	n.d.
9	2,6	2,4	2,5	14,7	TCA	TCA	28,6	Detetado
10	0,0	0,0	0,0	n.d.			0,0	n.d.
11	0,0	0,0	0,0	0,5			0,0	n.d.
12	0,0	0,0	0,0	0,8			0,0	n.d.
13	0,0	0,0	0,0	0,7			0,0	n.d.
14	0,0	0,0	0,0	0,6			0,0	n.d.
15	0,0	0,0	0,0	n.d.			0,0	n.d.
16	0,0	0,0	0,0	n.d.			0,0	n.d.
17	0,0	0,0	0,0	n.d.			0,0	n.d.
18	0,0	0,3	0,2	0,5			0,0	n.d.
19	0,0	0,0	0,0	0,6			0,0	n.d.
20	0,1	0,0	0,1	0,5			0,0	n.d.
21	0,0	0,0	0,0	0,5			0,0	n.d.
22	0,1	0,4	0,3	2,0			0,0	n.d.
23	0,0	0,0	0,0	n.d.			0,0	n.d.
24	0,3	0,0	0,2	n.d.			0,0	n.d.
25	0,0	0,0	0,0	0,6			0,0	n.d.
26	0,0	0,0	0,0	0,6			0,0	n.d.
27	0,0	0,0	0,0	3,9			0,0	n.d.
28	0,0	0,2	0,1	0,6			0,0	n.d.
29	0,0	0,0	0,0	0,6		TCA	14,3	Detetado
30	0,0	0,0	0,0	n.d.			0,0	n.d.
31	0,0	0,0	0,0	0,5			0,0	n.d.
32	0,0	0,0	0,0	n.d.			0,0	n.d.

33	0,2	0,3	0,3	0,7					0,0	n.d.
34	0,0	0,0	0,0	0,5					0,0	n.d.
35	0,0	0,0	0,0	n.d.					0,0	n.d.
36	0,0	0,1	0,1	n.d.					0,0	n.d.
37	1,4	1,5	1,5	1,7	TCA	TCA	TCA	TCA	57,1	TCA
38	0,4	0,1	0,3	0,5					0,0	n.d.
39	0,0	0,0	0,0	0,5					0,0	n.d.
40	0,0	0,0	0,0	0,6					0,0	n.d.
41	0,0	0,0	0,0	n.d.					0,0	n.d.
42	0,0	0,0	0,0	n.d.				TCA	14,3	Detetado
43	0,0	0,0	0,0	0,9					0,0	n.d.
44	0,0	0,0	0,0	n.d.					0,0	n.d.
45	0,0	0,0	0,0	n.d.	TCA			TCA	28,6	Detetado
46	0,0	0,1	0,1	n.d.					0,0	n.d.
47	0,0	0,0	0,0	n.d.					0,0	n.d.
48	0,0	0,0	0,0	0,6					0,0	n.d.
49	0,3	0,0	0,2	n.d.	TCA				14,3	Detetado
50	0,0	0,0	0,0	n.d.					0,0	n.d.



- Rolhas positivas

Produto: Rolhas de cortiça natural 45x24 Classe Extra  
 Quantidade: 50  
 Metodologia: Análise química e sensorial do vinho após 12 meses de engarrafamento  
 Data: 13-10-2014

*Tabela 9. Resultados de TCA em amostras de vinho, após 1 ano de engarrafamento, vedado com rolhas consideradas positivas pela MDI.*

Amostra	TCA (ng/L) vinho (SPME-GC-ECD)			TCA (ng/L) rolha	Análise sensorial (Painel de Provadores)						Resultado
	(1ª)	(2ª)	Média		1	2	3	4	5	TCA (%)	
1	8,6	9,1	8,9	49,1	TCA	TCA	TCA	TCA	TCA	100,0	<b>TCA</b>
2	11,8	11,3	11,6	33,9						0,0	n.d.
3	12,7	11,6	12,2	55,3	TCA	TCA				40,0	Detetado
4	25,0	27,4	26,2	63,4	TCA	TCA	TCA		TCA	80,0	<b>TCA</b>
5	0,3	0	0,2	44,0						0,0	n.d.
6	0,1	0	0,1	0,5						0,0	n.d.
7	10,0	4,1	7,1	25,2		TCA				20,0	Detetado
8	26,2	26,6	26,4	64,9	TCA	TCA		TCA	TCA	80,0	<b>TCA</b>
9	28,5	2,2	15,4	14,3						0,0	n.d.
10	47,7	43,9	45,8	67,6	TCA	TCA	TCA	TCA	TCA	100,0	<b>TCA</b>
11	142,2	141,9	142,1	130,8	TCA	TCA	TCA	TCA	TCA	100,0	<b>TCA</b>
12	39,0	41	40,0	49,6		TCA	TCA			40,0	Detetado
13	0,0	0,2	0,1	4,0		TCA				20,0	Detetado
14	0,0	0	0,0	0,6		TCA				20,0	Detetado

15	1,7	1,3	1,5	35,4	TCA					20,0	Detetado
16	0,0	0,4	0,2	n.d.	TCA					20,0	Detetado
17	1,3	1,1	1,2	50,3						0,0	n.d.
18	3,8	3,9	3,9	34,6	TCA					20,0	Detetado
19	9,0	9,1	9,1	12,1						0,0	n.d.
20	5,3	5,2	5,3	21,3	TCA					20,0	Detetado
21	2,3	2,5	2,4	36,0						0,0	n.d.
22	0,1	0	0,1	n.d.						0,0	n.d.
23	5,2	5,5	5,4	18,2	TCA				TCA	40,0	Detetado
24	90,6	85,9	88,3	98,7	TCA	TCA	TCA	TCA	TCA	100,0	TCA
25	0,0	0,2	0,1	32,2						0,0	n.d.
26	0,2	0,3	0,3	3,7			TCA			20,0	Detetado
27	0,2	0,2	0,2	26,9						0,0	n.d.
28	38,7	40	39,4	29,8	TCA	TCA	TCA		TCA	80,0	TCA
29	0,0	0	0,0	n.d.		TCA				20,0	Detetado
30	39,2	39,3	39,3	38,8	TCA	TCA			TCA	60,0	TCA
31	0,2	0,4	0,3	n.d.						0,0	n.d.
32	0,8	0,3	0,6	n.d.						0,0	n.d.
33	1,4	0,9	1,2	19,3		TCA				20,0	Detetado
34	9,3	10,1	9,7	60,8	TCA	TCA	TCA		TCA	80,0	TCA
35	34,6	35,8	35,2	64,8	TCA	TCA	TCA			60,0	TCA
36	0,0	0	0,0	n.d.						0,0	n.d.
37	0,0	0	0,0	11,0						0,0	n.d.
38	0,3	0	0,2	n.d.						0,0	n.d.
39	0,0	0	0,0	5,3						0,0	n.d.
40	48,3	51,3	49,8	85,1	TCA	TCA	TCA	TCA	TCA	100,0	TCA

41	26,6	26,6	26,6	90,0	TCA	TCA		40,0	Detetado	
42	32,8	32,6	32,7	23,0	TCA	TCA		40,0	Detetado	
43	1,0	0,6	0,8	17,6	TCA			20,0	Detetado	
44	9,2	9,4	9,3	22,2	TCA			20,0	Detetado	
45	59,3	63,5	61,4	75,4	TCA	TCA	TCA	60,0	TCA	
46	11,5	9,6	10,6	19,6				0,0	n.d.	
47	0,2	0	0,1	0,0				0,0	n.d.	
48	7,8	8,3	8,1	12,1				0,0	n.d.	
49	0,4	0	0,2	10,0				0,0	n.d.	
50	45,8	43,3	44,6	58,3	TCA	TCA	TCA	TCA	80,0	TCA